

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Fernande CHATAGNER

1^{re} Thèse — Métabolisme de l'acide L-cystéine sulfinique chez les animaux supérieurs.

2^e Thèse — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 Juin 1953 devant la Commission d'Examen.

M. AUBEL, *Président*,

M. FROMAGEOT }
M^{lle} LE BRETON } *Examineurs.*

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Fernande CHATAGNER

1^{re} Thèse — Métabolisme de l'acide L-cystéine sulfinique chez les animaux supérieurs.

2^e Thèse — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 15 Juin 1953 devant la Commission d'Examen.

M. AUBEL, *Président,*

M. FROMAGEOT }
M^{lle} LE BRETON } *Examineurs.*



THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Digitized by the Internet Archive
in 2026

1^{re} Thèse — Méthodes de l'analyse algébrique appliquées aux
systèmes algébriques.

2^e Thèse — Propriétés des courbes de la famille

de courbes de la forme $y = ax^2 + bx + c$.

3^e Thèse — Sur les

M. CHAMBERLAIN
M. LE BASTON

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen : M. A. CHATELET

PROFESSEURS

G. JULIA.....	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	M ^{lle} COUSIN.....	T	Biologie animale (P.C.B.).
A. DENJOY.....	T	Théorie des Fonctions.	CHRETIEN	T	Chimie minérale.
L. LUTAUD.....	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	P. DRACH.....	T	Zoologie.
E. DARMOIS.....	T	Enseignement de Physique.	KASTLER	T	Physique.
Robert LÉVY.....	T	Physiologie comparée.	CHATELET	T	Arithmétique et théorie des nombres.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	EPHRUSSI	T	Génétique.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
De BROGLIE.....	T	Théories physiques.	BAUER	T	Chimie-Physique.
JOB	T	Chimie générale.	RIVIERE		Géologie (P.C.B.).
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.	GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
COMBES	T	Physiologie végétale.	LUCAS	T	Physique.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	A. THOMAS	T	Evolution des êtres organisés.
PÈRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	ARNULF		Optique appliquée.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	MAX MORAND		Physique.
TOUSSAINT	T	Technique aéronautique.	SOLEILLET		Physique.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
G. RIBAUD	T	Hautes températures.	DANJON	T	Astronomie.
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste.	LAPORTE	T	Physique générale et Radio-activité.
DUPONT	T	Théories chimiques.	JANET	T	Mathématiques générales.
VALIRON	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	PETIT	T	Biologie maritime.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	GALLIEN		Biologie animale (P.C.B.).
Jacques BOURCART.	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	EICHHORN		Biologie végétale (P.C.B.).
AUBEL	T	Chimie biologique.	De CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.).
M ^{me} JOLIO-CURIE..	T	Physique générale et Radioactivité.	M ^{lle} CAUCHOIS.....	T	Chimie-Physique.
PLANTFOL	T	Botanique.	THELLIER		Physique du Globe.
CABANNES	T	Recherches physiques.	AUDUBERT		Electrochimie.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.	L'HÉRITIER		Génétique.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	GRIVET	T	Radio-Electricité.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	PONCIN		Mécanique des fluides.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
WYART	T	Minéralogie.	DUBREIL		Mathématiques générales.
TEISSIER	T	Zoologie.	QUELET		Chimie (P.C.B.).
MANGENOT	T	Biologie végétale.	CAGNIARD		Géophysique appliquée.
P. AUGER.....	T	Physique quantique et relativité.	CHAMPETIER		Chimie appliquée.
MONNIER		Physiologie générale.	CUVILLIER		Géologie structurale et Géologie appliquée.
PIVETEAU	T	Géologie.	JUNG	T	Pétrographie.
ROCARD	T	Physique.	TRILLAT		Physique (P.C.B.).
H. CARTAN.....	T	Mathématiques (E.N. Supérieure).	WIEMANN		Chimie (P.C.B.).
SCHAEFFER	T	Physiologie des fonctions.	JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.).
LAFFITTE	T	Chimie générale.	VASSY		Physique de l'atmosphère.
FAVARD	T	Mécanique générale.	DESTOUCHES		Théories physiques.
COULOMB	T	Physique du Globe.	M. PRUVOST.....	T	Géologie.
			AMIEL		Chimie (P.C.B.).
			HOCART		Minéralogie.
			MACHEBŒUF		Microbiologie.
			J.-P. MATHIEU		Physique (P.C.B.).
			COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.).
			MAY		Biologie animale (P.C.B.).
			CHOQUET		Calcul différentiel.
			FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
			GUINIER		Physique (P.C.B.).
			JOST		Biologie (P.C.B.).

Secrétaire : M. Ch. MONIER

I N T R O D U C T I O N

Les phénomènes d'oxydation portant sur les acides aminés soufrés et qui occupent une place prépondérante dans la dégradation de ces substances chez les animaux supérieurs, ont fait l'objet d'une revue récente due à Fromageot (1). Si les principales transformations qui se produisent lors du passage du soufre de la méthionine, de la cystine et de la cystéine à ses formes d'excrétion : sulfate et taurine sont connues, quelques points restent encore obscurs. Nous n'examinerons ici que le sort du soufre de la cystéine; le schéma 1, met en lumière l'existence de trois modes de dégradations de cet acide aminé. La première transformation fait intervenir le détachement du soufre de la molécule organique, avant toute oxydation, sous forme d'hydrogène sulfuré (2), qui est finalement oxydé en sulfate (3).

La seconde conduit à la taurine, par l'intermédiaire de l'acide cystéine-sulfonique (4-5), qui subit une décarboxylation enzymatique (6). Enfin, la troisième entraîne la formation de sulfate (7), ce qui nécessite là encore que le soufre soit détaché de la molécule organique à un stade ou à un autre d'oxydation, mais sans l'intervention d'hydrogène sulfuré comme produit intermédiaire.

On peut faire quelques remarques sur ce schéma. Tout d'abord, il convient de noter que l'on n'a isolé de l'organisme aucune des substances dont on admet la formation au cours des différentes dégradations envisagées, et que, par voie de conséquence, on ne possède pas de certitude quant à leur existence réelle. De plus, les recherches ont généralement été conduites au moyen de déterminations manométriques avec des préparations enzymatiques très peu purifiées, il est donc possible que certains produits intermédiaires aient échappé aux

investigations.

Cependant, il est établi que l'oxydation directe de la cystéine, c'est-à-dire sans passage par la cystine, peut finalement donner comme produits essentiels, soit du sulfate, soit de la taurine : du sulfate par l'intermédiaire de l'hydrogène sulfuré ou de l'acide cystéine-sulfinique, de la taurine par l'intermédiaire de l'acide cystéine-sulfonique. Signalons ici que Medes (5) a montré que les mêmes préparations enzymatiques qui sont responsables de la formation d'acide cystéine-sulfonique à partir de cystéine, sont également capables de donner de l'acide cystéine-sulfonique à partir de l'acide cystéine-sulfinique et qu'ainsi ce dernier intervient aussi lors du passage du soufre de la cystéine à la taurine.

Cette formation de taurine nécessite la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfonique, or, si certains animaux effectuent cette réaction, Blaschko, qui a découvert ce phénomène, a indiqué, dans une revue générale sur les décarboxylations (8) que d'autres animaux qui excrètent aussi de l'acide taurocholique ne possèdent pas de décarboxylase de l'acide cystéine-sulfonique, donc qu'il doit probablement exister un autre mode de formation de la taurine.

Quant à la genèse du sulfate, il convient de rappeler qu'il a été démontré de manière très nette (9-10-11-12) que l'acide cystéine-sulfonique ne constitue pas un intermédiaire entre la cystéine et le sulfate inorganique.

En ce qui concerne le passage de l'acide cystéine-sulfinique au sulfate, différentes hypothèses pour expliquer ce phénomène ont été émises par Pirie (7) et Medes et Floyd (13) mais sans que ces auteurs apportent de preuves expérimentales; un seul résultat net dans ce domaine est dû à Fromageot et Royané (14) qui ont indiqué que l'on pouvait obtenir, en conditions anaérobies, une formation de sulfite à partir d'acide cystéine-sulfinique en présence de foie de lapin. Ceci conduisait à admettre que le détachement du soufre de la molécule

organique précédait l'oxydation, donc que la première transformation portant sur l'acide cystéine-sulfinique était une désulfination.

L'ensemble de ces résultats amenait à penser que l'acide cystéine-sulfinique occupait une place importante dans la dégradation du soufre de la cystéine, et nous avons alors entrepris une étude systématique du sort que pouvait subir cet acide dans l'organisme; ce travail était rendu possible grâce à une méthode de synthèse chimique de l'acide L-cystéine-sulfinique qui permet de préparer des quantités relativement importantes de la substance constituant le point de départ de ces recherches.

L'exposé de ce travail comporte deux parties :

1^o - Synthèse de l'acide L-cystéine-sulfinique,

2^o - Métabolisme de l'acide L-cystéine-sulfinique,
qui se subdivise en :

- étude de la désulfination enzymatique in vitro
- étude de la décarboxylation enzymatique in vitro
- sort de l'acide L-cystéine-sulfinique, in vivo,
chez le rat.

Première Partie

SYNTHESE DE L'ACIDE L-CYSTEINE-SULFINIQUE

L'acide L-cystéine-sulfinique utilisé a été préparé selon Lavine (15) de la façon suivante : le ~~chlorhydrate~~^{perchlorate} de L-cystine est oxydé par l'acide perbenzoïque en L-cystine disulfoxyde, lequel est ensuite dismuté en cystine et acide L-cystéine-sulfinique.

a - Préparation de l'acide perbenzoïque.

Dans un erlenmeyer de 500 ml. 5,2 g. (0,22 atome-gramme) de sodium sont dissous dans 100 ml. d'alcool méthylique absolu. La solution de méthylate de sodium est refroidie à -5°; on y ajoute alors une solution de 50 g. (0,21 molécule) de peroxyde de benzoyle pur dans 200 ml. de chloroforme, cette opération doit être menée à 0°. On conserve le mélange pendant 4 à 5 minutes dans un bain sel-glace en l'agitant fréquemment; il devient laiteux, mais aucun précipité n'apparaît; on le transvase alors dans une ampoule à décanter de 1 litre dont les robinets ont été soigneusement débarrassés de toute trace de graisse, celle-ci pouvant contenir des catalyseurs métalliques qui détruisent immédiatement l'acide perbenzoïque. Le perbenzoate de sodium est ensuite extrait par 500 ml. d'eau distillée contenant beaucoup de glace pilée. La couche chloroformique est séparée, et la couche aqueuse est extraite deux fois avec des portions de 100 ml. de chloroforme froid pour enlever le benzoate de méthyle. La solution aqueuse contient le sel de sodium de l'acide perbenzoïque; cet acide est libéré par addition de 225 ml. d'acide sulfurique normal froid puis extrait en trois fois avec des portions de 100 ml. de chloroforme froid. Les solutions chloroformiques réunies sont lavées deux fois avec 50ml d'eau distillée, et la couche chloroformique est séparée avec soin. Le volume de la solution chloroformique laiteuse (humide)

est d'environ 300 ml. Le titrage iodométrique indique qu'elle contient 23,5 à 24 g. d'acide perbenzoïque; l'eau est la seule impureté présente. Pour obtenir une solution anhydre, on ajoute au liquide une petite quantité de sulfate de sodium sec. Après filtration, le volume de la solution est ramené à environ 150 ml. par concentration sous pression réduite. La quantité d'acide perbenzoïque présente dans la solution est déterminée par titrage iodométrique de la façon suivante : 1 ou 2 g. d'iodure de potassium sont dissous dans 50 ml. d'eau, on ajoute 5 ml. d'acide acétique glacial, 5 ml. de chloroforme, puis un volume connu de la solution chloroformique d'acide perbenzoïque; l'iode libérée est titrée par du thiosulfate de sodium N/10 dont 1 ml. correspond à 0,0069 g. d'acide perbenzoïque.

b - Préparation du cystine disulfoxyde.

12,01 g. de L-cystine sont mis dans un ballon jaugé de I litre avec environ 250 ml. d'acétonitrile; à la suspension, on ajoute, en agitant bien le liquide et en refroidissant le ballon dans un bain de glace, une quantité d'acide perchlorique à 70 % exactement équivalente à la cystine (0,10 molécule d'acide perchlorique) avec 300 ml. d'acétonitrile, puis une quantité mesurée volumétriquement d'anhydride acétique à 90 % équimoléculaire à 90 à 95 % de l'eau introduite avec l'acide perchlorique. Le mélange, toujours maintenu dans le bain froid, est agité jusqu'à dissolution de la cystine, puis filtré, si nécessaire, et on le laisse revenir à la température de la pièce. On introduit alors dans le ballon, placé à nouveau dans le mélange réfrigérant, une solution chloroformique d'acide perbenzoïque (0,12 molécule dans environ 150 ml.) et le volume du liquide est complété à I litre avec de l'acétonitrile.

Après deux heures de réaction à la température de la pièce, la solution est versée dans une ampoule à décanter et extraite avec 250 ml. d'acide chlorhydrique normal. La couche aqueuse, inférieure, est soutirée et la solution d'oxydation

est extraite avec 100 ml. d'acide chlorhydrique normal. Les deux solutions aqueuses sont mêlées et extraites 4 ou 5 fois avec des portions de 50 ml. de chloroforme, jusqu'à ce que le volume du chloroforme soutiré n'augmente plus (cette augmentation étant due à l'acétonitrile enlevé à la solution aqueuse.) Après filtration, la couche aqueuse est lentement neutralisée par de l'ammoniaque concentrée jusqu'à début de précipitation, on complète la neutralisation avec de l'ammoniaque diluée; la fin de la réaction est indiquée par le virage d'un papier au rouge Congo. On laisse le précipité se former pendant quelques heures à la glacière, puis il est recueilli sur un filtre en verre poreux, lavé à l'eau distillée, à l'alcool éthylique et à l'éther sulfurique anhydre; il est ensuite séché sous pression réduite à la température de la pièce. Le produit obtenu se présente sous forme d'une poudre blanche, légère; la mesure du pouvoir rotatoire, faite à chaque nouvelle préparation, indique $[\alpha]_D^{20} = - 34^\circ$ pour une concentration de 1 % dans HCl N. la quantité de disulfoxyde préparée à partir de 12,01 g. de cystine est d'environ 9,5 à 10 g.

c - Préparation de l'acide L-cystéine-sulfinique.

On dissout 2,72 g. de cystine disulfoxyde dans 10 ml. d'une solution ammoniacale obtenue en mélangeant volume pour volume de l'ammoniaque concentrée et de l'eau distillée; on laisse la dismutation se faire pendant plusieurs heures, alors que Lavine indiquait 1 heure, mais nous avons remarqué que l'augmentation de la durée de dismutation donnait de meilleurs rendements en acide cystéine-sulfinique. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite à température inférieure à 35° jusqu'à siccité; on reprend le résidu par de l'eau et évapore à nouveau jusqu'à disparition d'odeur ammoniacale. La cystine formée est éliminée par filtration, le liquide ainsi obtenu est légèrement jaune, il est décoloré sur charbon, puis la solution est évaporée à siccité. Le contenu du ballon

est repris par 3 ml. d'eau distillée et on laisse la solution à la glacière pendant 12 heures; ceci provoque presque toujours une nouvelle précipitation, ou tout au moins un louche, dûs à la cystine; or il importe d'éliminer très soigneusement la cystine avant acidification du liquide, car la présence de cette substance gêne considérablement la précipitation ultérieure de l'acide cystéine-sulfinique. Cette formation lente de cystine semble mettre en doute l'équation établie par Lavine :



Il paraîtrait plutôt que ce soit de la cystéine qui se forme d'abord, laquelle cystéine se transformerait ensuite lentement en cystine. Après élimination par filtration des dernières traces de cystine, le liquide est acidifié par la quantité théorique d'acide chlorhydrique nécessaire pour libérer l'acide L-cystéine-sulfinique de son sel d'ammonium. On évapore de nouveau à sec, reprend le précipité par le minimum d'eau, puis on ajoute quelques ml. d'alcool au liquide chauffé à 60° au bain marie. Par refroidissement la précipitation commence, et après 1 ou 2 heures à la glacière, le précipité est filtré sur filtre en verre poreux, lavé à l'alcool puis à l'éther anhydre, et séché sous pression réduite à la température de la pièce pendant quelques heures. On obtient environ 1 g. d'acide L-cystéine-sulfinique dans ces conditions.

Cet acide se présente sous forme d'une poudre blanche; la mesure du pouvoir rotatoire donne $[\alpha]_D^{20} = + 31^\circ$ pour une concentration de 1% dans HCl N.

Deuxième Partie

METABOLISME DE L'ACIDE L-CYSTEINE SULFINIQUE :

I - ETUDE DE LA DESULFINATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE L-CYSTEINE SULFINIQUE IN VITRO

Fromageot et Royané (14) avaient montré qu'il se forme du sulfite lorsque de l'acide cystéine-sulfinique est mis, en conditions anaérobies, en présence de broyat de foie de lapin. Nous avons entrepris l'étude du mécanisme de cette désulfination et la détermination des différents produits qui prennent naissance aux dépens de l'acide cystéine-sulfinique.

A - Techniques -

1 - Préparations enzymatiques -

Les préparations enzymatiques utilisées sont toujours obtenues à partir de foie de lapin de la façon suivante : un lapin d'environ 3 kg. maintenu au jeûne pendant 24 heures afin que le foie ne contienne pas trop de glycogène est assommé et saigné. Le foie, prélevé rapidement, est perfusé pendant 15 à 20 minutes par une solution de NaCl à 0,9 % refroidie à 4°; il est ensuite broyé au Turmix ou au broyeur Latapie, le broyat étant recueilli dans un bécher plongé dans la glace, ce broyat peut être employé directement aussitôt après sa préparation, mais, le plus souvent, il est transformé en poudre acétonique. Pour cela, on ajoute au broyat 5 fois son volume d'acétone anhydre, refroidie à -15°, on filtre sur büchner à la chambre froide, reprend la poudre dans le même volume d'acétone et filtre à nouveau; la poudre est enfin traitée par 5 fois son volume d'éther anhydre refroidi à -15°. Par filtration on obtient un résidu solide que l'on broie au mortier puis que l'on sèche, sous pression réduite, à la température de la pièce pendant

quelques heures. 10 g. de broyat donnent environ 2 g. de poudre acétonique. Celle-ci, conservée à la glacière à -15° , garde la même activité que le broyat pendant plusieurs jours; cette activité diminue ensuite progressivement avec le temps. A partir de cette poudre acétonique, il est possible d'obtenir des extraits enzymatiques liquides en traitant n g. de poudre par n. 10 ml. d'eau distillée ou n. 10 ml. d'une solution de bicarbonate de sodium à 0,16% pendant 30 minutes à 4° ; après centrifugation, le résidu solide est remis en suspension dans quelques ml. d'eau ou de solution de bicarbonate puis on centrifuge à nouveau; les liquides sont réunis, filtrés sur laine de verre pour éliminer les particules solides surnageantes, et le volume de l'extrait est complété, si nécessaire, à n.10 ml. Un tel extrait enzymatique renferme environ 25 à 30 mg. de matière sèche par ml; (non compris le poids du bicarbonate dans le cas où la préparation est faite dans cette solution). Le pH de cet extrait est toujours d'environ 6,4.

Pour certaines expériences nous avons utilisé des extraits dialysés; dans ce cas, l'extrait liquide préparé comme indiqué précédemment est placé dans un tube de cellophane et dialysé, à la chambre froide, contre de l'eau distillée lorsque la durée de la dialyse est inférieure à 7 h. ou contre une solution aqueuse de bicarbonate de sodium à 100 mg. par litre si la dialyse doit être prolongée pendant 24 heures. Ceci permet, dans l'un et l'autre cas, de ne pas faire descendre le pH du liquide dialysé au-dessous de 6, ce qui entraînerait une dénaturation des protéines actives. Une première purification de l'extrait liquide a été obtenue au moyen de la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium (72 g. pour 100 ml. d'extrait donnent une solution saturée en sulfate d'ammonium). La solution ainsi préparée est agitée pendant 30 minutes à la chambre froide, puis centrifugée; le précipité de protéines est mis en suspension dans de l'eau distillée (environ la moitié du volume de l'extrait initial), puis dialysé à froid contre une solution de bicarbonate de sodium à 100 mg. par litre pendant 24 h.

La dialyse ayant pour but d'éliminer complètement le sulfate d'ammonium, le volume de solution de bicarbonate employé doit être important (de l'ordre de 10 litres pour 100 ml. d'extrait initial). Dans d'autres essais la précipitation a été faite avec des solutions de sulfate d'ammonium à 35, 50 ou 60% de saturation, la méthode restant la même.

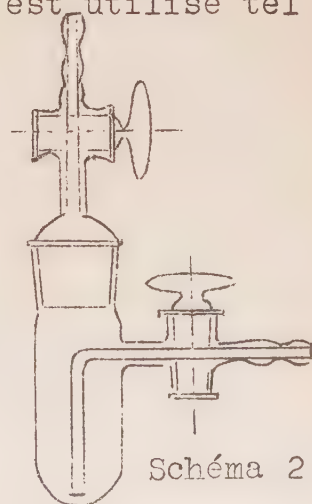
Pour certaines déterminations, nous avons été amenés à utiliser des extraits liquides "déprotéinisés" que nous avons préparés à partir d'extraits liquides en maintenant ceux-ci au bain marie bouillant pendant 4 à 5 minutes; après centrifugation le liquide surnageant est recueilli, le culot est rincé par un peu d'eau distillée, puis centrifugé à nouveau et les deux liquides sont réunis. Le volume de l'extrait déprotéinisé ainsi obtenu est, si nécessaire, complété avec de l'eau distillée de façon que le volume final soit identique au volume initial de l'extrait. Le poids sec d'une telle solution, contenant l'extrait de 1 g. de poudre acétonique, est de l'ordre de 10 à 15 mg. par ml.

2 - Extrait de levure de boulangerie -

Au cours de nos recherches nous avons utilisé des extraits de levure de boulangerie, obtenus en traitant de la levure fraîche de boulangerie par son poids d'eau distillée à 100° pendant 10 à 15 minutes; le liquide recueilli après centrifugation et dont le pH est d'environ 6,4 est utilisé tel quel, ou, si nécessaire, concentré sous pression réduite à température inférieure à 35° pour être ramené à un volume convenable.

3 - Composition des cellules -

Toutes les réactions enzymatiques ont été faites dans des cellules dont le schéma est donné ci-contre; on introduit successivement dans chaque cellule :



- la préparation enzymatique,
- un mélange de tampon phosphate pH = 7,3
- les solutions, amenées à un pH voisin de 7, des différentes substances dont l'action sur la désulfination a été étudiée
- l'acide cystéine-sulfinique neutralisé par du bicarbonate de sodium.

Dans la plupart des cas le volume final de la solution est de 25 ml. le volume de la préparation enzymatique de 10 ml. et la concentration finale en tampon M/30.

L'atmosphère de la cellule est constituée par de l'azote, pour cela on fait passer un courant d'azote pendant 7 minutes dans la cellule maintenue dans un bain de glace, lorsqu'on utilise un extrait enzymatique aqueux et du tampon phosphate, ou par un mélange gazeux à 95% d'azote et 5% d'anhydride carbonique si l'extrait enzymatique a été préparé dans une solution de bicarbonate à 0,16%; dans ce dernier cas le pH du milieu est encore très voisin de 7,3.

4 - Méthodes de dosages -

a - Acide cystéine-sulfinique.

Le dosage de cet acide est fait, après acidification franche du milieu par addition de quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, au moyen d'une solution titrée de permanganate de potassium environ 0,018 M, selon la technique de Schubert (16).

b - Anhydride sulfureux.

Après un temps de réaction convenable, la cellule est retirée du thermostat et refroidie dans un bain de glace, on introduit par le robinet du chapeau, sans faire entrer d'air, 3 ml. d'acide phosphorique pur et une goutte d'alcool octylique pour éviter la formation de mousses. L'anhydride sulfureux éventuellement formé est déplacé par un courant d'azote, et recueilli dans un barboteur contenant 20 ml. d'une solution de soude environ N/10. Des essais préliminaires, faits avec une

solution connue de sulfite de sodium, nous ont permis de déterminer que, si le passage de l'azote a lieu pendant 30 minutes et si la cellule est chauffée progressivement jusqu'à ébullition, on recueille au moins 90% de l'anhydride sulfureux présent dans la cellule. C'est donc ces conditions que nous avons adoptées. La solution de soude contenue dans le barboteur est ensuite transvasée dans^{un} erlenmeyer de 100 ml., on rince 2 fois le barboteur avec quelques ml. d'eau distillée, les eaux de rinçage sont ajoutées au liquide; on introduit alors 2 ml. d'une solution d'iode N/10; puis 3 ml. d'acide chlorhydrique N et on titre l'excès d'iode par du thiosulfate de sodium N/20.

c - Alanine -

Nous nous adressons, pour ce dosage, à la méthode d'Alexander et Seligman (17), qui consiste à traiter l'alanine par la ninhydrine en tampon phosphate à pH 5,5 et à recueillir l'acétaldéhyde formé dans une solution de bisulfite de sodium. La combinaison bisulfitique est acidifiée et l'aldéhyde libéré est dosé par colorimétrie après réaction avec le para-hydroxydiphényl.

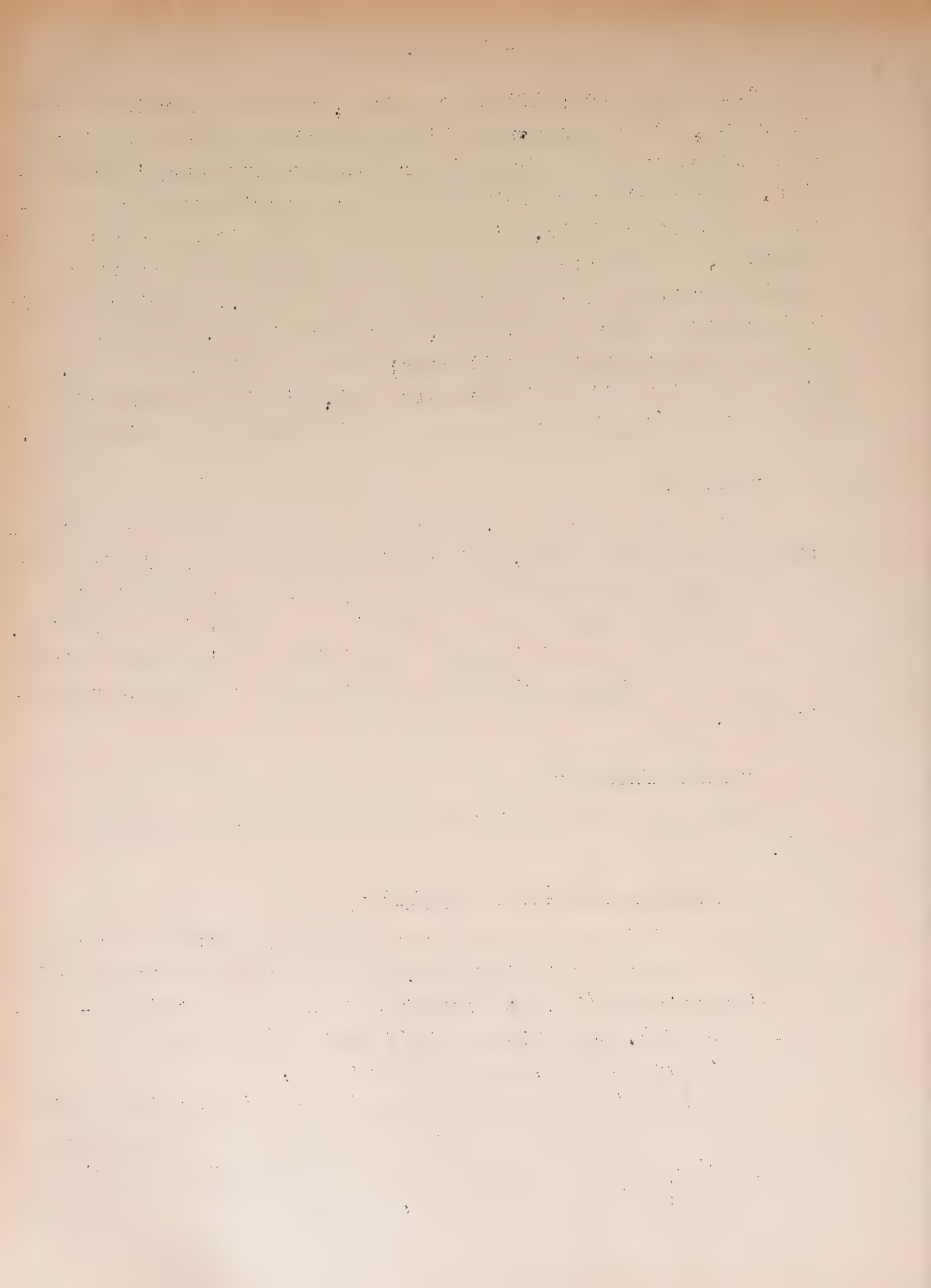
d - Azote aminé -

Nous employons la technique classique de Van Slyke-Neill (18).

e - Chromatographie sur papier -

Nous utilisons la méthode de Consden, Gordon et Martin (19) et employons le papier Whatman n° 1 et les solvants phénol à 1% d'ammoniaque (19) et butanol - 75 - acide formique - 15 - eau - 10 - (20). Les acides aminés sont révélés par une solution de ninhydrine à 0,2% dans le butanol.

Rappelons ici les Rf des principaux acides aminés présents dans nos solutions, Rf indiqués dans les deux publications précitées ou déterminés au laboratoire (cas des acides aminés précédés d'une astérique).



	Phénol-NH ₃	Butanol-Acide formique-eau
Ø Acide cystéine-sulfonique	0,05	0,04
Acide aspartique	0,12	0,16
Ø Acide cystéine-sulfinique	0,12	0,08
Acide glutamique	0,23	0,27
Glycocolle	0,41	0,17
Ø Taurine	0,40	0,07
Alanine	0,55	0,31
Ø β -alanine	0,63	0,22

B - Mise au point de techniques permettant la séparation et le dosage des différents constituants formés par la désulfination -

1 - Séparation de l'alanine et de l'acide cystéine-sulfinique.

Des expériences préliminaires nous ont montré que l'acide cystéine-sulfinique interfère avec l'alanine dans le dosage décrit par Alexander et Seligman; en effet la présence d'acide cystéine-sulfinique augmente beaucoup la quantité d'acétaldéhyde trouvée. La labilité de la liaison C-S de l'acide cystéine-sulfinique rendait ainsi illusoire tout essai d'une autre méthode basée sur la production d'acétaldéhyde à partir de l'alanine seule, et faisant intervenir, après la désamination des acides aminés par l'acide nitreux, l'oxydation des hydroxyacides correspondants, soit par le permanganate (21), soit par les ions cériques (22).

Nous avons donc dû mettre au point une méthode permettant de séparer l'acide cystéine-sulfinique de l'alanine éventuellement formée. Il nous est apparu qu'il n'était guère possible d'éliminer complètement l'acide cystéine-sulfinique par précipitation sous forme de sel de baryum en présence d'alcool : la chromatographie sur papier a montré en effet qu'il subsistait

toujours dans le milieu des quantités notables d'acide cystéine-sulfinique. On pouvait également espérer éliminer l'acide cystéine-sulfinique par oxydation à l'aide de permanganate de potassium, puis doser l'alanine restée intacte; mais là encore nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants. Nous avons réussi à séparer l'acide cystéine-sulfinique de l'alanine par adsorption chromatographique sur alumine "acide" dont on connaît le pouvoir d'adsorption sélective des acides aminés dicarboxyliques. Nous avons utilisé une colonne de 1 cm. de diamètre contenant 5 g. d'alumine acide préparée selon Wieland (23) et lavée d'après les indications de Jutisz et Lederer (24). L'étude de l'adsorption, puis de l'élution de l'acide cystéine-sulfinique seul a été faite dans les conditions suivantes : on fait passer sur la colonne adsorbante 3 ml. d'une solution amenée à pH 5 et pouvant contenir jusqu'à 10 mg. d'acide cystéine-sulfinique, dans de l'eau ou dans du bicarbonate de sodium à 0,16%; on lave ensuite la colonne avec 50 ml. d'eau distillée; les liquides obtenus constituent le filtrat. La colonne est ensuite éluée par 15 ml. d'une solution de soude N/2, puis par 15 ml. d'une solution de soude N/10. On dose l'acide dans l'éluat et dans le filtrat par le permanganate; l'acide cystéine-sulfinique est retrouvé quantitativement dans l'éluat. Nous avons vérifié que, dans ces conditions, l'alanine seule passe intégralement dans le filtrat : pour cela, 3 ml. d'une solution de bicarbonate de sodium à 0,16% contenant environ 500 μ g d'alanine et amenée à pH 5 est chromatographiée sur une même colonne d'alumine qui est ensuite lavée avec 50 ml. d'eau distillée; l'ensemble du filtrat est amené à 10 ml. par concentration sous pression réduite. L'alanine est dosée sur 1 ml. de ce liquide; elle est retrouvée quantitativement dans le filtrat. Enfin, nous avons appliqué cette technique au mélange d'acide cystéine-sulfinique et d'alanine, en opérant toujours sur 3 ml. de solution. L'ensemble des résultats, donnés dans le tableau 1, montre que la séparation et la récupération de l'acide cystéine-sulfinique et de l'alanine sont satisfaisantes

dans les conditions employées. Il apparaît ainsi qu'il est parfaitement possible de déterminer, avec une précision suffisante, la teneur d'une solution en alanine, même lorsque cette solution contient au départ une quantité importante d'acide cystéine-sulfinique.

TABLEAU I

Séparation et dosage de l'alanine et de l'acide cystéine-sulfinique

acide cystéine-sulfinique initial (mg.)	Alanine initiale (µg.)	Acide cystéine-sulfinique dans l'éluat (mg.)	Alanine dans le filtrat (µg.)	Acide cyst-sulf. trouvé (%)	Alanine trouvée (%)
7,50	0	7,44	-	99,2	-
10,00	0	9,50	-	95,0	-
1,42	0	1,31	-	92,4	-
0	500	-	490	-	98,0
10,00	500	9,45	560	94,5	112
10,00	500	8,91	545	89,1	109
8,57	428	9,00	430	105	100

2 - Action de la ninhydrine sur l'acide aspartique, l'acide cystéine-sulfinique, l'acide cystéine-sulfonique, et l'alanine.

Nous avons vu que l'acide cystéine-sulfinique réagit au cours du traitement à la ninhydrine dans la méthode d'Alexander et Seligman, alors que l'acide aspartique ne gêne en rien le dosage de l'alanine, dans les conditions indiquées par ces auteurs. Etant donnée l'analogie de structure entre l'acide aspartique, l'acide cystéine-sulfinique, et l'acide cystéine-sulfonique, nous avons étudié parallèlement l'action de la ninhydrine sur ces 3 acides dans les mêmes conditions et nous

avons comparé leur comportement à celui de l'alanine.

Dans le ballon à réaction de l'appareil d'Alexander et Seligman, on introduit 1,0 ml. de la solution aqueuse de l'acide aminé, 2,0 ml. de solution tampon et 1,0 ml. d'une solution aqueuse de ninhydrine à 1%. On porte à ébullition pendant 75 minutes. L'acétaldéhyde éventuellement produit est recueilli dans 8 ml. d'une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 1%, le tube contenant cette solution étant maintenu dans l'eau glacée. A la fin de la réaction, le volume de la solution de bisulfite est amené à 10 ml. et le dosage colorimétrique de l'aldéhyde est fait sur une partie aliquote avec le parahydroxydiphényl, selon la méthode habituelle, en utilisant le photomètre de Pulfrich (filtre S 57).

Les solutions tampons employées sont les suivantes :

pH = 1 : acide phosphorique 0,24 M (25)

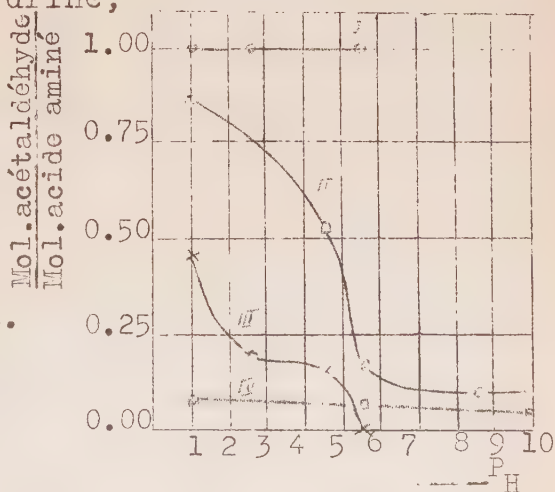
pH = 2,4 et pH = 4,7 : mélanges citrate trisodique et acide citrique 0,10 M (25)

pH = 5,5, pH = 6,9, pH = 8,4 : mélanges phosphates 0,067 M.

pH = 10,0 : mélange borate de sodium et acide borique 0,10 M.

L'influence du pH de la solution sur la formation de l'acétaldéhyde à partir de l'acide cystéine-sulfinique, de l'acide aspartique, de l'acide cystéine-sulfonique et de l'alanine, sous l'action de la ninhydrine,

est illustrée par la figure 1 dont les courbes correspondent à une quantité d'acides aminés de 1,3 μ mol. dans le milieu réactionnel. Il apparaît tout d'abord



que la formation d'acétaldéhyde à partir de l'alanine reste quantitative quel que soit le pH.

L'acide cystéine-sulfinique donne lieu à une production importante d'aldéhyde, production qui dépend considérablement du pH. Elle atteint 86% de la quantité théoriquement possible à $\text{pH} = 1$, et baisse avec la concentration en ions H, mais sans s'annuler. Elle est encore de 17,2% à $\text{pH} = 5,5$, pH auquel se fait le dosage de l'alanine dans la méthode d'Alexander et Seligman, puis descend à 10,3% à $\text{pH} = 7,0$, valeur qu'elle garde constante jusqu'à $\text{pH} = 10$ au moins.

Tenant compte, d'une part de la spécificité de la réaction du parahydroxydiphényl avec l'acétaldéhyde, telle qu'elle a été soulignée par Alexander et Seligman, d'autre part de la structure de l'acide cystéine-sulfinique, il semblait très probable que l'aldéhyde produit par action de la ninhydrine sur l'acide cystéine-sulfinique fût l'acétaldéhyde. Il nous a paru pourtant utile de le caractériser directement, et pour ce faire, nous avons soumis 2 mg. d'acide cystéine-sulfinique à l'action de la ninhydrine à $\text{pH} = 1$, dans les conditions expérimentales précédentes; l'aldéhyde formé a été recueilli dans une solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans HCl 2 N, maintenue dans l'eau glacée. L'hydrazone, lavée par HCl 2 N, puis par l'eau froide, est recristallisée dans le benzène. Séchée sous vide à 100°, la substance obtenue fond à 162°. Le point de fusion du mélange de la substance avec l'acétaldéhyde-2-4-dinitrophénylhydrazone est 162°. Il s'agit donc bien ici de l'acétaldéhyde.

L'acide aspartique donne également naissance à de l'acétaldéhyde, mais en quantités moindres, toutes conditions égales d'ailleurs, que l'acide cystéine-sulfinique. Comme dans ce dernier cas, la formation d'acétaldéhyde décroît avec la concentration en ions H; mais ici cette formation s'annule pratiquement à pH 5, ce qui permet de doser sans difficulté, à ce pH ou à des pH supérieurs, l'alanine en présence d'acide aspar-

tique. La genèse d'acétaldéhyde à partir de l'acide aspartique sous l'action de la ninhydrine est un phénomène non encore totalement élucidé. En effet, à des pH compris entre 1 et 4,7, 1 molécule d'acide aspartique libère 2 molécules de CO_2 (25), ce qui implique qu'elle subit une décarboxylation en β et permettrait d'envisager alors la formation concomittante d'une molécule d'acétaldéhyde. Mais d'autre part, dans le même intervalle de pH, la désamination de l'acide aspartique par la ninhydrine n'est pas totale et atteint seulement 80% (26).

Quant à l'acide cystéine-sulfonique, sa décomposition en acétaldéhyde est très faible même à $\text{pH} = 1$, où elle n'atteint guère que 9%; elle décroît régulièrement pour n'être plus que de 4% environ de la quantité théorique à $\text{pH} = 10$. D'autre part, les chiffres du tableau 2 montrent que, dans les conditions expérimentales réalisées, la production d'acétaldéhyde est proportionnelle à la quantité d'acide cystéine-sulfonique mise en jeu, et ce, quel que soit le pH.

TABEAU 2

Influence de la concentration en acide cystéine-sulfonique sur la quantité d'acétaldéhyde formée.

Mêmes conditions expérimentales que dans les déterminations précédentes, sauf en ce qui concerne la concentration en acide cystéine-sulfonique.

pH	Micromolécules d'acide aminé	Micromolécules d'acétaldéhyde formées	$\frac{\text{Mol. aldéhyde. 100}}{\text{Mol. acide aminé}}$
1	13,0	11,5	88,5
1	6,5	5,5	84,6
1	3,25	2,81	86,5
2,4	13,0	10,1	77,7
2,4	6,5	5,28	81,3
4,5	13,0	6,97	52,2
4,5	6,5	3,15	48,5
5,5	13,0	2,25	17,3
5,5	6,5	1,35	20,8

La formation d'acétaldéhyde à partir des trois diacides aminés étudiés ici, est évidemment l'indice de la rupture entre l'atome de carbone β et le groupement acide qu'il porte. Il n'est pas possible de dire avec certitude si cette rupture précède, accompagne ou suit la décarboxylation et la désamination qui portent sur le carbone α ; toutefois, d'après ce que l'on sait de l'action de la ninhydrine, il est probable que la rupture portant sur le carbone β se fait après les transformations subies par le carbone α . L'étude de la désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique nous a d'ailleurs permis de vérifier cette hypothèse, nous le verrons par la suite.

Quoiqu'il en soit, il apparaît dès maintenant que la labilité de la liaison C-S est considérablement plus grande dans l'acide cystéine-sulfinique que dans l'acide cystéine-sulfonique, ce qui correspond bien à la différence de comportement biologique de ces deux acides, et elle est plus grande que la labilité de la liaison C-C correspondante de l'acide aspartique dont on connaît la stabilité relative vis-à-vis de divers systèmes enzymatiques.

3 - Séparation des acides aminés dicarboxyliques et de l'acide cystéine-sulfinique.

Les phénomènes de la désulfination provoquent la formation dans le milieu réactionnel d'acides aminés dicarboxyliques qu'il importe de séparer de l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé. On sait que la chromatographie sur alumine acide ne permet pas de réaliser une telle séparation; pour l'effectuer, nous avons utilisé avec succès la permutite 50 (Etablissements Philips et Pain), qui est une résine fortement acide, échangeur de cations, à groupements polystyrènes sulfonés. Elle absorbe les cations minéraux et les acides aminés, alors qu'elle laisse passer les anions minéraux, les oses et les dérivés sucrés, certains polypeptides...; seule, parmi les acides aminés couramment étudiés, la taurine n'est pas retenue

sur permutite 50. L'élution par l'ammoniaque diluée libère les acides aminés de la colonne de permutite; dans ces conditions les cations minéraux ne sont pas élués (27).

La permutite 50 (gros­seur des grains comprise entre les tamis 30 et 50) est mise en suspension dans l'eau distillée et versée sur une colonne de 1 cm. de diamètre intérieur; elle est lavée, avant usage, successivement par de l'acide chlorhydrique 2N, de l'eau distillée, de la soude N exempte de CO_2 , de l'eau distillée, de l'acide chlorhydrique 2N, et enfin de l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du liquide effluent soit celui de l'eau distillée.

Pour 5 g. de permutite utilisée, la colonne est lavée, après le passage de la solution à analyser, par 50 ml. d'eau. Elle est ensuite éluee par 50 ml. d'ammoniaque normale. L'éluat est concentré à sec, repris par quelques millilitres d'eau distillée, et concentré à nouveau pour éliminer totalement l'ammoniaque. Nous avons étudié le comportement d'un mélange synthétique comprenant de l'acide cystéine-sulfinique, de l'acide aspartique et de l'alanine sur une telle colonne en opérant de la manière suivante : on fait passer sur une colonne de 5 g. de permutite, traitée comme il a été dit plus haut, 10 ml. d'une solution contenant 46,8 μ molécules d'acide cystéine-sulfinique, 112,4 μ molécules d'alanine et 75,2 μ molécules d'acide aspartique, on rince la colonne par 50 ml. d'eau distillée, ce qui donne le filtrat, puis on élue par 50 ml. d'ammoniaque N.

L'analyse qualitative du filtrat et de l'éluat a été faite par chromatographie sur papier Whatman n° 1, dans le solvant butanol-acide formique-eau; le chromatogramme est ensuite révélé à la ninhydrine. D'après les résultats de ce chromatogramme, on peut conclure que :

- l'acide cystéine-sulfinique n'a pas été retenu sur la colonne, et on le retrouve dans le filtrat.
- l'acide aspartique et l'alanine ont été retenus sur la colonne et élués par l'ammoniaque puisqu'ils n'existent que

dans l'éluat. Il convenait alors de déterminer si cette séparation était, ou non, quantitative; pour ce faire, nous avons effectué des dosages d'azote aminé sur le filtrat et sur l'éluat, ainsi que le dosage de l'alanine de l'éluat. Le tableau 3 donne les résultats de ces dosages.

TABLEAU 3

Séparation d'acides aminés sur permutite 50

Nature de l'ac.aminé	Acide aminé introduit (μ mol.)	Acide aminé retrouvé (μ mol.)	% acide aminé retrouvé
Acide cyst. sulf.	46,8	45,2	96,5
Alanine	112,4	112,4	100
Alanine + Ac. aspart.	187,6	184,0	98,0

L'emploi de permutite 50 permet donc d'effectuer quantitativement la séparation de l'acide cystéine-sulfinique d'une part et des dicarboxyliques et de l'alanine d'autre part, c'est-à-dire la séparation de l'acide cystéine-sulfinique et des produits formés au cours de la désulfination. Cette résine donne ainsi une méthode pour l'étude quantitative de cette réaction.

C - Résultats -

1 - Nature enzymatique de la désulfination.

Nos premières expériences ont eu pour but de déterminer si le détachement du groupement soufré de la molécule d'acide cystéine-sulfinique était le résultat d'une action enzymatique; en utilisant dans les mêmes conditions, d'une part les préparations fermentaires à l'état frais, et d'autre part les mêmes préparations placées, avant emploi, pendant 10 minutes au bain marie bouillant, nous avons obtenus les chiffres indiqués dans

le tableau 4; ces résultats prouvent qu'il s'agit bien ici d'une réaction enzymatique, en effet seule des quatre cellules employées, la première, qui contient en même temps un extrait de foie et de l'acide cystéine-sulfinique en milieu tamponné, donne une production de sulfite; l'acide cystéine-sulfinique lui-même n'étant pas décomposé au cours du dosage de l'anhydride sulfureux.

TABLEAU 4

Détermination de la nature enzymatique de la désulfination

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3	Cel.4
Broyat de foie frais (g.)	10	10	0	0
Broyat de foie bouilli (g.)	0	0	0	10
Tampon phosphate M/30 pH= 7,2 (ml.)	20	20	20	20
Ac.L-cyst.sulf.neu- tralisé (mg.)	100	0	100	100

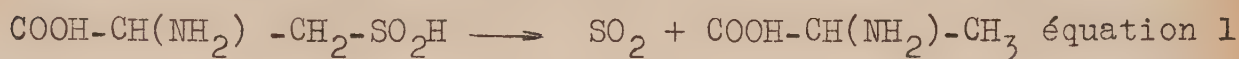
Durée de la réaction : 2 heures - Température : 38°

Cellules	μ mol. SO_2
1	40
2	2
3	2
4	2

2 - Sort de la chaîne carbonée de la molécule d'acide cystéine-sulfinique.

Après avoir mis en évidence la formation enzymatique de sulfite, il restait à déterminer la nature du produit formé par

la désulfination et comprenant la partie carbonée de la molécule. Etant donnée la formule de l'acide cystéine-sulfinique, l'hypothèse la plus probable était la genèse d'alanine d'après l'équation globale :



Pour vérifier cette hypothèse, il convenait de doser simultanément sur un même milieu réactionnel l'anhydride sulfureux formé, l'alanine éventuellement apparue, et l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé au cours de la désulfination enzymatique.

Le dosage de l'anhydride sulfureux nécessitant une très forte acidification du milieu qui n'est plus utilisable ensuite pour l'analyse des constituants organiques, une partie aliquote (4ml.) du liquide de la cellule est prélevée, après réaction, sous courant d'azote. Cette prise est portée au bain-marie bouillant pendant 5 minutes pour coaguler les protéines, on centrifuge, lave le résidu avec un peu d'eau distillée bouillante, on réunit les liquides de centrifugation et de lavage et on complète leur volume à 7,5 ml. On soumet ces 7,5 ml. à la chromatographie sur alumine acide. On dose l'alanine sur le filtrat et l'acide cystéine-sulfinique sur l'éluat. Les 6 ml. restés dans la cellule, toujours sous atmosphère d'azote, sont acidifiés pour le dosage de SO_2 . Les résultats obtenus dans cette expérience sont donnés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

Résultats analytiques d'une expérience de désulfination enzymatique de l'acide L-cystéine-sulfinique

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3	Cel.4	Cel.5
Extrait bicarbonaté frais (ml.)	10	10	10	0	0
Extrait bicarbonaté bouilli (ml.)	0	0	0	10	10
Ac.cyst.sulf.neutralisé (mg.)	20	20	0	20	0

Durée de réaction 2 heures - Température : 38°

Cellules	Alanine totale (mg.)	SO ₂ dosé (mg.)	Subs. réductrices expri- mées en Ac. cyst. sulf. (mg.)
1	5,36	3,10	14,7
2	5,34	3,39	14,1
3	1,42	0,51	4,6
4	2,11	0,00	34,0
5	2,34	0,10	15,9

Les chiffres du tableau 5 permettent de calculer :

- les quantités d'alanine apparue au cours de l'action enzymatique :

cellule 1 : $5,36 - 1,42 = 3,94$ mg. = 44,3 μ mol.

cellule 2 : $5,34 - 1,42 = 3,92$ mg. = 44,0 μ mol.

- les quantités de SO₂ formé :

cellule 1 : $3,10 - 0,51 = 2,59$ mg. = 38,9 μ mol.

cellule 2 : $3,39 - 0,51 = 2,88$ mg. = 45,0 μ mol.

- les quantités d'acide cystéine-sulfinique disparu :

cellule 1 : $25 - (14,7 - 4,6) = 14,9$ mg. = 97,5 μ mol.

cellule 2 : $25 - (14,1 - 4,6) = 15,5$ mg. = 101,0 μ mol.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont groupés dans le tableau 6.

TABIEAU 6

Désulfination enzymatique de l'acide L-cystéine-sulfinique.

Alanine apparue (μ mol.)	SO ₂ apparue (μ mol.)	Alanine/SO ₂	Ac. cyst. sulf. disparu (μ mol.)
44,3	38,9	1,14	97,5
44,0	45,0	0,98	101,0
30,9	25,6	1,20	97,0
25,8	26,8	0,96	107,0
		moyenne : 1,07	

Il apparaît ainsi que, dans la limite des erreurs inhérentes au mode opératoire, la production d'une molécule d'anhydride sulfureux est bien accompagnée de la formation d'une molécule d'alanine.

L'équation 1 qui a été proposée semble donc valable. Nous verrons plus loin qu'elle n'est que le résultat d'une série de réactions élémentaires. Il convient en outre de remarquer que la quantité d'acide cystéine-sulfinique qui disparaît est très notablement supérieure à celle qui correspond à l'équation précédente.

3 - Déterminations des conditions optima de la désulfination.

Les conditions optima de fonctionnement de la désulfination ont été déterminées à l'aide de la poudre acétonique ou de l'extrait obtenu à partir de cette poudre. Les résultats sont indiqués dans les tableaux 6, 7 et 8. Rappelons que les extraits préparés soit en solution aqueuse, soit en solution bicarbonate, présentent sensiblement le même pouvoir de désulfination.

TABLEAU 6

Détermination de la température optima de la désulfination.

Contenu des cellules : poudre acétonique : lg. tampon phosphate M/30 pH 7,3 : 10 ml. Acide cystéine-sulfinique neutralisé : 20 mg.

Durée de la réaction : 2 heures.

Température °C.	p mol. SO ₂
10	6,10
20	20,80
30	33,70
35	52,80
40	50,70
45	46,40
50	45,50
60	0

TABLEAU 7

Détermination du pH optimum de la désulfination.

Conditions identiques à celles du tableau 6.

Température : 35°

pH	μ mol.SO ₂
6,80	12,35
7,15	30,05
7,35	35,40
7,60	22,80

TABLEAU 8

Détermination de la quantité maxima de SO₂ dégagé en fonction du temps.

Conditions identiques à celles du tableau 7

pH = 7,3	
Durée (minutes)	μ mol.SO ₂
75	44
120	56
140	58
210	50

De l'examen de ces trois tableaux, il ressort que les meilleures conditions d'étude de la désulfination enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique sont les suivantes :

Température : 35° pH : 7,3. Durée : 2 heures.

Ces conditions seront adoptées dans les expériences ultérieures.

L'influence de la durée sur le dégagement de SO₂ sera reprise plus en détail lors de l'étude cinétique de la désulfination.

4 - Nécessité d'un cofacteur pour la réaction enzymatique, et existence de ce cofacteur dans la levure de boulangerie.

L'influence de la dialyse sur un extrait bicarbonate de poudre de foie a été étudiée; pour ce faire une partie de cet extrait est utilisée immédiatement, une autre est dialysée pendant 7 heures à 42° contre une solution de bicarbonate à 0,16% une troisième est maintenue dans les conditions de la dialyse sans être dialysée. D'autre part, nous préparons dans les mêmes conditions un extrait qui est déprotéinisé, puis concentré sous pression réduite, de telle sorte que 5 ml. du liquide concentré correspondent à 1 g. de poudre. Les résultats obtenus au cours de cette expérience sont indiqués dans le tableau 9.

De ces résultats, on peut conclure que :

- La dialyse entraîne la disparition presque totale de l'activité enzymatique.
- Le maintien dans les conditions de la dialyse d'un extrait frais diminue légèrement son pouvoir de désulfination.
- L'extrait frais qui a perdu par dialyse presque toute son activité, est susceptible d'être fortement réactivé par addition d'un extrait bouilli qui ne présente, seul, pratiquement aucune action sur l'acide cystéine-sulfinique.

Donc le système enzymatique responsable de la désulfination de l'acide L-cystéine-sulfinique est susceptible d'être scindé en une partie thermolabile, et en un facteur thermostable qu'on retrouve dans un extrait déprotéinisé par la chaleur.

TABLEAU 9

Suppression de la désulfination par dialyse. Réactivation d'un extrait dialysé par addition d'un extrait déprotéinisé.

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3	Cel.4	Cel.5
Extrait bicarbonate frais (ml.)	10	0	0	0	0
Extrait bicarbonate frais maintenu dans conditions de la dialyse (ml.)	0	10	0	0	0
Extrait bicarbonate frais dialysé (ml.)	0	0	10	10	0
Extrait bicarbonate déprotéinisé (ml.)	0	0	0	5	5
Solution bicarbonate (ml.)	5	5	5	0	10
Ac.cyst.sulf.neutralisé. (mg.)	20	20	20	20	20

Cellules

μ mol. SO_2

1	40,2
2	28,5
3	5,0
4	30,2
5	5,5

Les préparations enzymatiques, même non dialysées, sont également susceptibles d'être activées par addition d'extrait déprotéinisé. Le tableau 10 présente les résultats obtenus; ces résultats montrent que l'addition de cofacteur donne à la préparation enzymatique une activité maxima qui ne peut être ensuite dépassée, quelle que soit la quantité de cofacteur ajoutée en excès.

TABLEAU 10

Activation par le cofacteur d'une préparation enzymatique

La concentration de l'extrait déprotéinisé représentée par 1 est telle que 10 ml. de solution correspondent à 1 g. de poudre acétonique.

Les cellules sont préparées de la même manière que dans le tableau 9.

Cellules	Sol.enzymatique (ml.)	Concentration de la solution de cofacteur	μ mol.	% SO ₂ dégagé
			absolu	corrigé ÷
1	10	0	31	31
2	10	1	51	45
3	10	2	65	54
4	10	4	75	53
5	10	6	88	55
6	0	2	11	-

÷ Corrections tenant compte de l'activité résiduelle des solutions de cofacteur.

Les expériences précédentes indiquent que les solutions de cofacteur obtenues après un chauffage de 4 minutes présentent encore par elles-mêmes une légère action sur l'acide cystéine-sulfinique. Nous avons constaté qu'il est possible de supprimer pratiquement cette action en traitant la solution enzymatique au bain-marie bouillant pendant 15 minutes au lieu de 4. Mais on obtient alors des solutions de cofacteur sensiblement moins actives. Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

TABLEAU 11

Influence du temps de déprotéinisation sur le cofacteur.

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3	Cel.4	Cel.5
Extrait bicarbonate (ml.)	5	5	5	0	0
Extrait déprotéinisé 4' (ml.)	0	5	0	5	0
Extrait déprotéinisé 15' (ml.)	0	0	5	0	5
Eau distillée (ml.)	5	0	0	5	5
Solution bicarbonate (ml.)	10	10	10	10	10
Ac.cyst.sulf.neutralisé (mg.)	10	10	10	10	10

Cellules	μ mol. absolu	SO ₂ dégagé corrige $\div$
1	15	15
2	38	32
3	27	25
4	6	-
5	2	-

$\div$ Voir note du tableau 10.

Il convenait de déterminer si le cofacteur de la désulfuration était de nature organique ou non, et pour cela d'étudier l'influence des cendres. L'expérience est faite ici avec une solution enzymatique non préalablement dialysée, mais susceptible toutefois d'être notablement activée par une solution de cofacteur. Les cendres sont obtenues par calcination dans une capsule de platine de l'extrait sec de 10 ml. de solution de coenzyme correspondant à 4 g. de poudre acétonique. Le produit de cette calcination est dissous dans l'eau acidulée, et la solution, ajustée à pH 7,0 est amenée à 10 ml. Le tableau 12 in-

dique les résultats obtenus.

TABLEAU 12

Action comparée de l'extrait déprotéinisé et de ses cendres.

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3
Extrait frais (ml.)	5	5	5
Extrait déprotéinisé (ml.)	0	5	0
Solution de cendres (ml.)	0	0	5
Eau distillée (ml.)	5	0	0
Sol.bicarbonate (ml.)	10	10	10
Ac.cyst.sulf.neutralisé (mg.)	10	10	10
Cellules	μ mol. SO ₂ dégagé		
1	24		
2	58		
3	2		

Poids sec de la solution de cendres : 6,5 mg./ml.

Il apparait ainsi que, non seulement les cendres n'ont aucun pouvoir activant, mais que au contraire elles exercent une action inhibitrice nette sur la désulfination.

Ces résultats permettent d'établir la nature organique d'une partie au moins du cofacteur de la désulfination. Nous avons recherché si ce cofacteur existe dans un extrait de levure de boulangerie, que l'on sait être particulièrement riche en coenzymes, cofacteurs, groupements prosthétiques et catalyseurs de nombreuses réactions enzymatiques. Le tableau 13 donne les premiers chiffres obtenus dans les essais de réactiva-

tion par l'extrait de levure.

TABLEAU 13

Activation d'une solution enzymatique par un extrait de levure.

Contenu des cellules	Cel.1	Cel.2	Cel.3
Extrait aqueux frais (ml.)	5	5	0
Extrait de levure (ml.)	0	5	5
Tampon phosphate (ml.)	10	10	10
Eau distillée (ml.)	5	0	5
Ac.cyst.sulf.neutralisé (mg.)	10	10	10
Cellules	µ mol. SO ₂ dégagé		
1	16,1		
2	46,5		
3	2,5		

L'activation d'un extrait frais par un extrait de levure, qui n'exerce lui-même aucune action sur l'acide cystéine-sulfonique, est très nette.

Il convenait d'étudier alors l'action de quantités croissantes d'extrait de levure de boulangerie sur la désulfination. Les résultats de cette recherche sont exprimés dans les tableaux 14 et 15.

TABLEAU 14

Influence de la concentration en extrait de levure sur l'activation d'une préparation enzymatique non dialysée.

La concentration de l'extrait de levure représentée par 1 est telle que 1 ml. de solution correspond à 1 g. de levure. Les cellules contiennent 10 ml. d'extrait aqueux frais et 20mg. d'acide cystéine-sulfinique.

Cellules	Concentration de l'extrait de levure	μ mol. SO ₂ dégagé
1	0	49,2
2	2	64,2
3	5	80,6
4	10	77,9
5	20	77,2

TABLEAU 15

Influence de la concentration en extrait de levure sur l'activation d'une préparation enzymatique dialysée.

Les conditions sont identiques à celles du Tableau 14

Cellules	Concentration de l'extrait de levure	μ mol. SO ₂ dégagé
1	0	6,0
2	2	35,6
3	5	51,8
4	10	58,1
5	20	51,2

Dans les conditions adoptées ici, l'addition à une préparation enzymatique, dialysée ou non, de l'extrait de levure obtenu à

partir de 5 à 10 g. de levure fraîche est suffisante pour avoir l'activité maxima de désulfination.

5 - Détermination de la concentration optima en acide cystéine-sulfinique et la durée optima pour la désulfination, dans une préparation enzymatique activée au maximum par un extrait de levure.

Pour la détermination de la concentration optima en acide cystéine-sulfinique, nous avons fait 2 séries d'expériences, l'une avec un extrait frais non dialysé, l'autre avec un extrait frais dialysé. Les tableaux 16 et 17 donnent l'ensemble des résultats obtenus.

TABLEAU 16

Influence de la concentration en acide cystéine-sulfinique sur la désulfination d'une préparation enzymatique non dialysée.

Les conditions sont identiques à celles du tableau 14, sauf en ce qui concerne la concentration en acide cystéine-sulfinique.

Cellules	Ac.cyst.sulf. (mg.)	μ mol.SO ₂ dégagé
1	10	37,4
2	20	75,4
3	30	103,3
4	40	102,8
5	50	108,4
6	70	104,2
7	90	104,4

TABLEAU 17

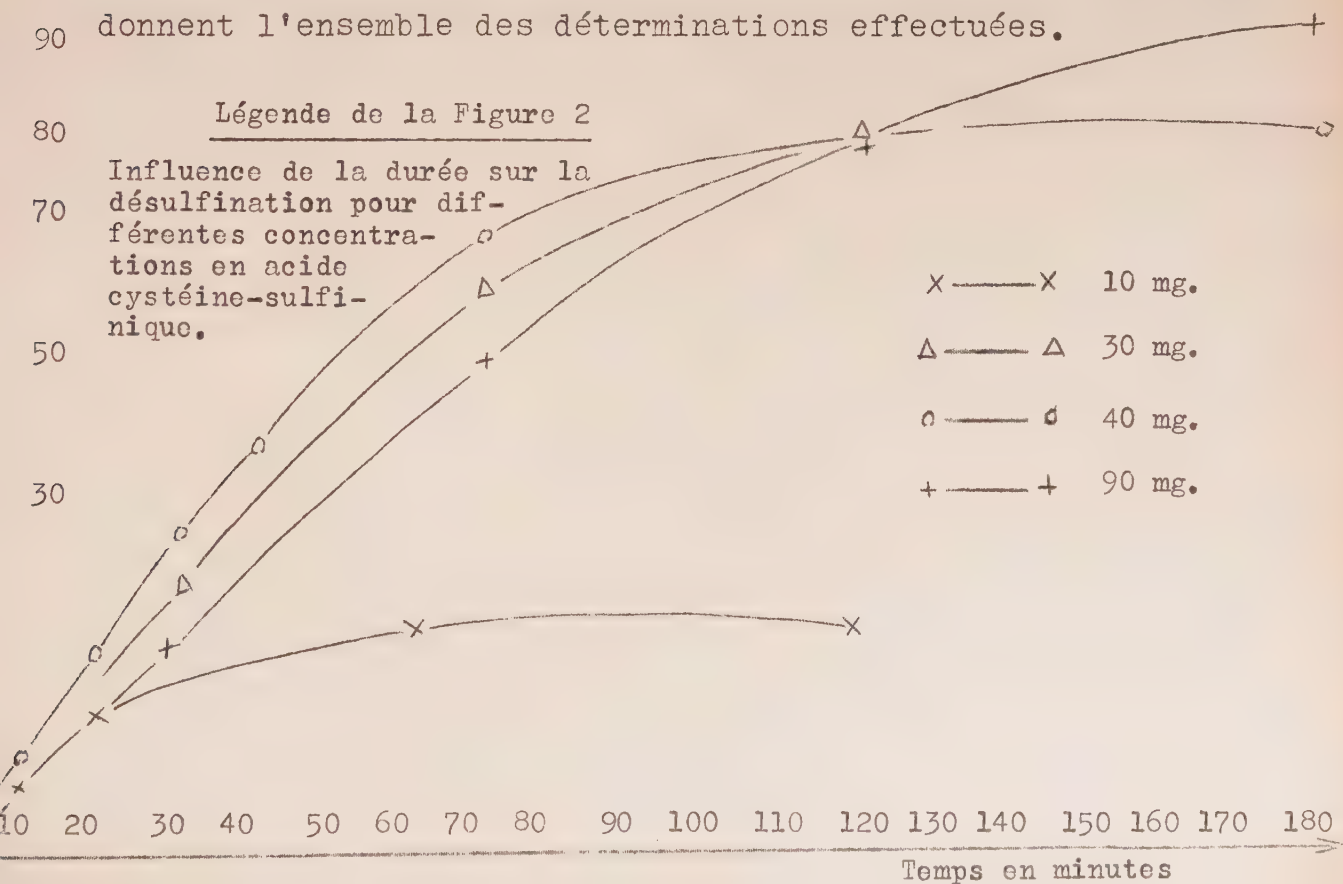
Influence de la concentration en acide cystéine-sulfinique sur la désulfuration d'une préparation enzymatique dialysée.

Les conditions sont identiques à celles du tableau 15, mais l'extrait aqueux a été dialysé.

Cellules	Ac.cyst.sulf. (mg.)	μ mol. SO ₂ dégagé
1	10	41,6
2	20	65,6
3	30	75,8
4	50	81,8

Dans les conditions utilisées ici, une concentration en acide cystéine-sulfinique égale à 30 mg. est suffisante pour obtenir la désulfuration maxima.

Tenant compte des résultats obtenus au cours de toutes les expériences précédentes, nous avons repris l'étude, dans les conditions de désulfuration optima, de l'influence de la durée sur la réaction enzymatique. Les courbes de la figure 2 donnent l'ensemble des déterminations effectuées.



L'étude de ces courbes et l'examen des tableaux 16 et 17 permettent de conclure que :

- la durée nécessaire et suffisante pour la désulfination est de l'ordre de 120 minutes pour une concentration de 30 à 40 mg. d'acide cystéine-sulfinique.
- La vitesse initiale de désulfination atteint son maximum pour une concentration en acide cystéine-sulfinique égale à 30-40 mg. La pente de la courbe est alors constante pendant les 40 premières minutes de la réaction.

6 - Essais d'activation de la désulfination par des cofacteurs coenzymes, et groupements prosthétiques connus.

En même temps que se poursuivaient les expériences précédentes, l'étude de l'influence sur les préparations enzymatiques préalablement débarrassées de cofacteur par dialyse, de diverses substances jouant un rôle dans de nombreuses réactions enzymatiques, et en particulier les coenzymes des réactions de décarboxylation, celles-ci semblant les plus proches de la désulfination, était entreprise. Ceci a conduit à essayer les substances suivantes : pyridoxal phosphate, pantothénate de calcium, lactoflavine, biotine, acide nicotinique, uracile, inositol, acide folique, glutathion, vitamine B₆, uridine-diphosphate-glucose, flavine-adénine-dinucléotide. Aucun de ces produits n'a permis la réactivation même partielle de l'extrait. Cependant, d'autres substances, si elles ne sont pas capables d'effectuer la réactivation totale de l'extrait, ont néanmoins, sur la réaction enzymatique, un effet non négligeable. A cet égard, il faut signaler particulièrement le rôle de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés, de l'adénosine-triphosphate, de la coenzyme II (TPN) et des ions Mg et Mn, agissant ensemble ou isolément. (Tableaux 18 et 19).

Signalons ici que la concentration finale en acide cystéine-sulfinique dans les cellules est, comme dans toutes les expériences qui suivront, 10^{-2} M., soit 38 mg. pour un volume de

liquide réactionnel de 25 ml. La solution enzymatique est constituée par 10 ml. d'extrait aqueux et toutes les expériences seront faites en tampon phosphate.

TABLEAU 18

Activation de la désulfination d'un extrait non dialysé.

A - Les concentrations employées sont les suivantes : Cl_2Mg :
Thiamine et dérivés phosphorylés : 50 γ 10^{-2}M .

Cellules	Substance ajoutée	$\mu\text{mol.SO}_2$
1	0	18,3
2	Extrait de levure (2ml.)	92,9
3	Extrait de levure (9ml.)	105,0
4	Cl_2Mg	28,5
5	Thiamine	16,5
6	Thiamine + Cl_2Mg	48,8
7	Thiamine monophosphate	19,6
8	Th.monophos.+ Cl_2Mg	49,8
9	Thiamine diphosphate	14,9
10	Th.diphos.+ Cl_2Mg	47,2

B - Les concentrations employées sont les suivantes :

Cl_2Mn : $2,5 \cdot 10^{-2}\text{M}$; TPN : 1000 γ .

Cellules	Substance ajoutée	$\mu\text{mol.SO}_2$
1	0	28,4
2	Cl_2Mn	32,6
3	Cozymase II	21,6
4	Cl_2Mn + Cozymase	39,5

TABLEAU 19

Activation de la désulfuration d'un extrait dialysé.

Les concentrations employées sont les suivantes : $\text{Cl}_2\text{Mg}:10^{-2}\text{M}$.

ATP : 10 mg. Thiamine et dérivés phosphorylés : 25 μ .

Cellules	Substance ajoutée	μ mol. SO_2
1	0	8,8
2	Cl_2Mg	8,5
3	ATP	29,0
4	ATP + Cl_2Mg	28,7
5	Th.+ Cl_2Mg	7,5
6	Th.+ ATP+ Cl_2Mg	33,5
7	Th.monop.+ Cl_2Mg	12,6
8	Th.monop.+ATP+ Cl_2Mg	37,8
9	Th.diphos.+ Cl_2Mg	12,1
10	Th.diphos.+ATP+ Cl_2Mg	39,8
11	Extrait de levure (9ml.)	99,5

L'examen des chiffres des tableaux 18 et 19 montre, de manière nette, le rôle activateur des substances précitées. Toutefois, la réactivation de la préparation enzymatique n'est jamais comparable à celle obtenue avec l'extrait de levure, même en augmentant la concentration des substances ajoutées. En particulier, en ce qui concerne la thiamine et ses dérivés phosphorylés, l'augmentation de la concentration provoque un effet inhibiteur très net. Ceci exclut que les divers composés étudiés ici (ATP, Thiamine et dérivés phosphorylés) soient les cofacteurs de la désulfuration. Il semble qu'ils prennent part à des réactions secondaires dont le mécanisme n'a pas encore été approfondi.

7 - Essais de purification du cofacteur à partir de l'extrait de levure.

Les expériences précédentes n'ayant pas permis d'identi-

fier le cofacteur, et ce dernier existant en quantité appréciable dans l'extrait de levure, la purification de la substance active à partir de cet extrait a été entreprise, tant pour essayer d'isoler le cofacteur lui-même que pour déterminer quelques-unes de ses propriétés chimiques. Pour cette purification, l'extrait de levure (EL) est précipité par 6 fois son volume d'acétone à -20°, le précipité obtenu par centrifugation (PA₆) renferme la quasi totalité du cofacteur. Ce précipité est repris par un peu d'eau distillée et le liquide obtenu est amené à pH 5 pour être chromatographié sur une colonne d'alumine acide à raison de 10 g. d'alumine pour 50 ml. d'extrait initial. Le filtrat est totalement inactif, tandis que l'éluat obtenu en traitant la colonne par NaOH N/10 possède un QSO₂ beaucoup plus élevé que l'extrait de levure et le précipité acétonique. Le tableau 20 indique les résultats d'un des essais de purification.

TABEAU 20

Purification partielle du cofacteur de la désulfination à partir d'un extrait de levure de boulangerie.

Source du cofacteur	Poids sec de cofacteur (mg.)	μmol.SO ₂ (extrait dialysé + cofacteur)
EL	100	54,9
EL	250	80,9
EL	500	92,0
PA ₆	77	68,5
PA ₆	155	97,0
Eluat	6,5	67,5
Eluat	12,5	78,6

QSO₂ = mm³ de SO₂/mg./2 heures, pour une réactivation de l'extrait dialysé = 75 μ mol.SO₂.

EL = 8

PA₆ = 19,7

Eluat = 168

Ces essais montrent que le cofacteur est une substance acide, facilement retenue sur une colonne d'alumine, et facilement éluée par la soude. Il est donc stable en milieu fortement alcalin. D'autres expériences ont prouvé sa grande stabilité en milieu acide : après traitement de l'éluat d'alumine lyophilisé, par l'acide chlorhydrique 10% à 175° pendant 2 heures 30 minutes, le pouvoir réactivateur du cofacteur n'est pas diminué. Cette dernière expérience prouve en outre que le cofacteur n'est pas hydrolysable, donc ne possède pas une structure complexe type hétéroside phosphorylé.

8 - Essais d'inhibition de la désulfination.

Dans le but de déterminer quelques autres propriétés du cofacteur, nous avons essayé de trouver des inhibiteurs de la réaction enzymatique. Les résultats, indiqués dans le tableau 21 font ressortir d'une manière très nette le rôle primordial, comme inhibiteurs, des réactifs des groupements CO et CHO.

TABEAU 21

Essais d'inhibition de la désulfination.

Pour chaque inhibiteur, il a été vérifié que sa présence ne gêne en rien le dégagement de SO₂ de la cellule, ceci au moyen d'une solution connue de sulfite de soude.

EF = Extrait aqueux.

Inhibiteurs	EF + EL μ mol. SO ₂	EF + EL + Inhi. μ mol. SO ₂	% Inhibition
CNK 1	82,8	14,1	82,9
CNK 2	"	8,7	89,4
Phénylhydrazine 1	"	17,0	79,4
Phénylhydrazine 2	"	14,1	82,9
Semicarbazide 1	66,3	43,9	33,8
Semicarbazide 2	"	18,1	72,7
Hydroxylamine 1	"	8,9	86,7
Hydroxylamine 2	"	0,8	98,8
Cl ₂ Cu 2	44,2	2,6	96,7
Cl ₂ Hg 2	21,4	0,0	100
(CH ₃ COO) ₂ Ag 2	"	"	"
1 = concentration finale dans la cellule 5.10 ⁻³ M			
2 = " " " " " 10 ⁻² M			

Il était intéressant également d'étudier l'action sur la désulfination d'acides aminés tels que l'alanine et l'acide aspartique : l'alanine étant un des produits de la désulfination, et l'acide aspartique possédant une structure analogue à celle de l'acide cystéine-sulfinique. Les résultats obtenus, indiqués dans le tableau 22, sont à première vue contradictoires. Soulignons ici le fait que dans les diverses expériences, l'extrait aqueux a été ou non totalement réactivé par l'extrait de levure. Nous verrons par la suite comment nous proposons d'interpréter ces phénomènes.

TABLEAU 22

Essais d'inhibition de compétition de la désulfination.

Acide aminé	EF + EL (μ mol SO ₂)	EF + EL + Acide aminé (μ mol SO ₂)
Alanine 10 ⁻² M	82,8	19,1
" 10 ⁻³ M	31,7	66,6
" 10 ⁻² M	"	52,0
" 10 ⁻¹ M	"	57,6
Ac.Aspar. 10 ⁻² M	82,8	13,8
" 10 ⁻³ M	31,7	57,1
" 10 ⁻² M	"	56,3
" 10 ⁻¹ M	"	50,5

9 - Rôle des acides cétoniques.

Tenant compte des indications données dans les paragraphes précédents, nous avons été amenés à étudier dans nos préparations enzymatiques le rôle des acides cétoniques. Nous avons alors observé que l'addition d'acide pyruvique en quantité équimoléculaire à l'acide cystéine-sulfinique introduit provoque une augmentation nette de la désulfination. Des expériences analogues, faites avec l'acide α -cétoglutarique, ont abou-

ti à la réactivation totale de l'extrait dialysé. Le tableau 23 rend compte de cet ensemble de résultats.

TABLEAU 23

Augmentation de la désulfination par les acides cétoniques.

Préparation enzymatique : solution de protéines précipitées par le sulfate d'ammonium à saturation. Dans toutes les cellules, il a été ajouté du chlorure de magnésium à la concentration finale : $10^{-3}M$.

Cellules	Extrait de levure(ml.)	Acide α -céto- glutarique(μ mol)	Acide pyruvi- que (μ mol)	SO ₂ formé (μ mol.)
1	0	0	0	5
2	2	0	0	75
3	9	0	0	96
4	0	25	0	51
5	0	250	0	80
6	0	0	250	46

10 - Détermination des produits formés au cours de la désulfination.

Pour déterminer le mécanisme de l'action de l'acide pyruvique et de l'acide α -céto-glutarique sur la désulfination, il convenait d'identifier et de doser les acides aminés qui se forment au cours de la réaction. Pour cela on prépare deux cellules identiques, l'une (cellule A) à la cellule 1 du tableau 23, l'autre (cellule B) à la cellule 4 du même tableau. Après incubation, une fraction du milieu réactionnel (10 ml./25 ml.) est déprotéinisée par la chaleur, le liquide surnageant est analysé par chromatographie sur papier.

Sur le schéma 3, schéma du chromatogramme ainsi obtenu, on observe, pour le liquide ^{de} la cellule B, une tache due à l'acide cystéine-sulfinique, une autre correspondant à l'acide glutamique et enfin une troisième dont l'alanine est responsable.

Ces trois acides aminés sont les seuls présents dans le milieu. Le liquide déprotéinisé de la cellule B est chromatographié sur une colonne de permutite 50 (5 g. pour la fraction étudiée). Le tableau 24 indique les résultats des dosages effectués sur le filtrat (acide cystéine-sulfinique) et sur l'éluat (acide glutamique et alanine). La fraction du milieu non déprotéinisée a été utilisée pour le dosage de SO_2 .

Schéma 3

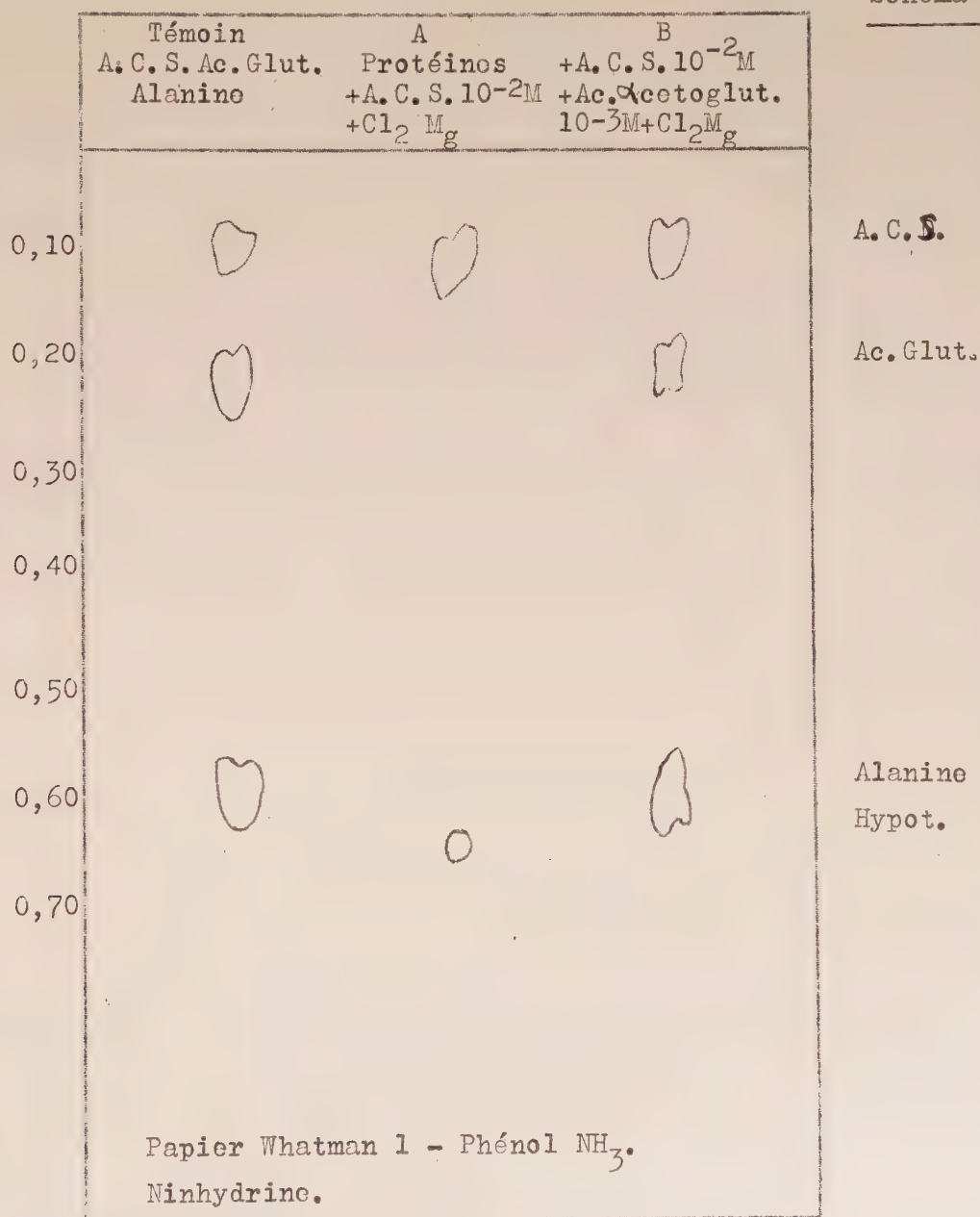


TABLEAU 24

Bilan de la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique.

Préparation enzymatique : solution de protéines précipitées par le sulfate d'ammonium à saturation. Cl_2Mg : 10^{-3}M . Acide α -cétoglutarique : $10^{-3}\text{M} = 25\mu\text{mol}$.

A.C.S. restant ($\mu\text{mol.}$) I	SO_2 formé ($\mu\text{mol.}$) II	Alanine apparue ($\mu\text{mol.}$) III	Ac.glut. apparu ($\mu\text{mol.}$) IV	N aminé retrouvé ($\mu\text{mol.}$) I+III+IV
118	51	53	34	205

Les chiffres du tableau 24 montrent :

- une formation équimoléculaire de SO_2 et alanine.
 - la disparition d'environ la moitié de l'acide cystéine-sulfinique introduit.
 - la formation d'une quantité appréciable d'acide glutamique.
- D'autres déterminations faites en fonction du temps ont abouti aux résultats suivants. (tableau 25)

TABLEAU 25

Bilan de la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique en fonction du temps.

Mêmes conditions générales que dans l'essai du tableau 23.

A = réaction ayant eu lieu pendant 1 heure.

B = " " " " " 2 " s.

C = " " " " " 3 " s.

Ac.cyst.sulf. restant($\mu\text{mol.}$) I	SO_2 formé ($\mu\text{mol.}$) II	Alanine apparue ($\mu\text{mol.}$) III	Ac.glutamique apparu ($\mu\text{mol.}$) IV	N aminé retrouvé ($\mu\text{mol.}$) I+III+IV
Acide α -cétoglutarique = 10^{-3}M .				
A 163	21	41	33	237
B 139	47	56	27	221
C 93	55	82	30	205

Acide α -cétoglutarique = $10^{-2}M$.

A	87	86	56	85	228
B	92	75	65	65	222

Dans la première partie du tableau 25, on trouve :

- une disparition progressive d'acide cystéine-sulfinique.
- une apparition constante d'acide glutamique.
- une augmentation progressive de SO_2 .
- une augmentation de l'alanine plus considérable que celle de SO_2 : la quantité d'alanine est encore équimoléculaire à SO_2 au bout de 2 heures, mais elle est nettement supérieure au bout de 4 heures.

On peut remarquer que l'alanine formée est toujours égale à la moitié de l'acide cystéine-sulfinique disparu.

Dans la seconde partie du tableau, la quantité d'acide cystéine-sulfinique disparue est la même en 1 heure et en 2 heures. Le nombre de μ molécules de SO_2 diminue légèrement entre 1 heure et 2 heures, tandis que l'alanine augmente et que l'acide glutamique diminue.

Dans tous les cas l'addition de phosphate de pyridoxal à nos préparations enzymatiques n'a amené aucune augmentation de la désulfination.

11 - Schéma général de la désulfination.

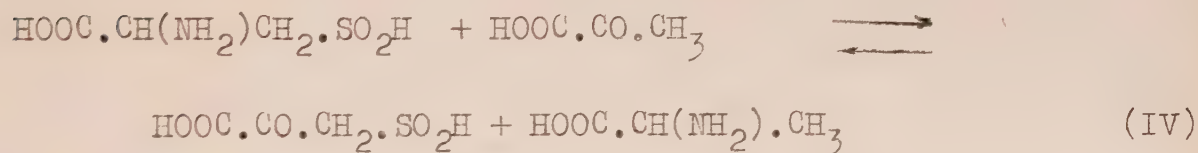
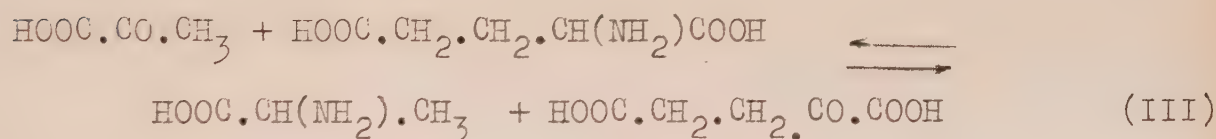
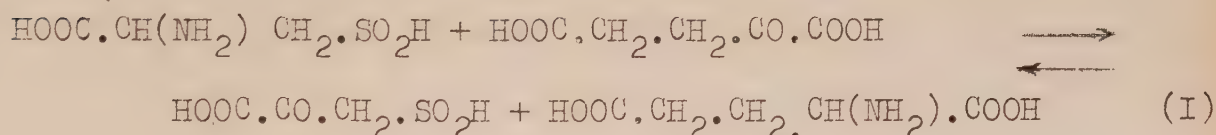
Les résultats obtenus au cours des expériences précédentes amènent à penser que la désulfination de l'acide L-cystéine-sulfinique se produit par l'intermédiaire des réactions indiquées dans le schéma 4 : réactions de transaminations précédant et suivant la désulfination.

Une première transamination entre l'acide cystéine-sulfinique et l'acide α -cétoglutarique conduit à la formation d'acide β -sulfinylpyruvique et d'acide glutamique. L'acide β -sulfinylpyruvique formé est scindé ensuite en SO_2 et acide pyruvique. Ce dernier est transformé en alanine, par transamination,

soit avec l'acide glutamique formé, soit avec l'acide cystéine-sulfinique restant.

Schéma 4

Schéma général de la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique.



l'acide β -sulfinylpyruvique n'est pas décomposé en SO_2 et acide pyruvique seulement au moment du dosage, car cette hypothèse rendrait compte de la formation d'acide glutamique et de SO_2 , mais pas de l'apparition d'alanine. Donc, l'acide β -sulfinylpyruvique subit une désulfination, enzymatique ou non, qui entraîne la production de SO_2 et d'acide pyruvique, et par suite la genèse de l'alanine s'explique par les transaminations III et IV. La formation d'alanine se produisant avec l'acide pyruvique venant de la désulfination, on devrait retrouver une quantité de SO_2 au moins équimoléculaire à l'alanine; surtout dans le cas où la transamination IV serait prépondérante : or ceci est vrai au bout de 2 heures, mais ne l'est plus après 4 heures de réaction. Il faut donc admettre qu'une partie du SO_2 formé

échappe au dosage, par suite d'une transformation quelconque, transformation qui s'accroît avec le temps. On peut aussi remarquer que, dans le cas d'une concentration en acide α -céto-glutarique égale à celle de l'acide cystéine-sulfinique, au bout d'une heure, l'acide cystéine-sulfinique ne subit plus de transformations et la formation d'alanine se fait alors par la transamination III, c'est-à-dire aux dépens de l'acide glutamique. Lorsque la concentration en acide α -céto-glutarique est égale à 1/10 de celle de l'acide cystéine-sulfinique introduit, la transamination IV semble se produire préférentiellement puisque la quantité d'acide glutamique reste constante en fonction du temps alors que la quantité d'acide cystéine-sulfinique diminue.

CONCLUSIONS

De l'ensemble des résultats précédents, on peut conclure que le détachement du soufre de la molécule d'acide cystéine-sulfinique, c'est-à-dire le passage du soufre de la forme organique à la forme minérale, est fonction de la présence dans le milieu biologique de la molécule facilement dialysable qu'est un acide cétonique (pyruvique ou α -céto-glutarique); par suite, la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique nécessite une désamination et une oxydation préalables de la molécule, ce qui est réalisé par transamination. Rappelons ici que la décarboxylation en β de l'acide aspartique est également précédée d'une transamination.

Si l'on pousse plus loin l'analogie, on peut comparer le sort de l'acide β -sulfinylpyruvique et celui de l'acide oxalacétique. Si l'on connaît l'existence d'une β -décarboxylase de l'acide oxalacétique (28), il n'en est pas moins vrai que ce dernier peut être décarboxylé spontanément. La désulfination de l'acide cystéine-sulfinique est-elle enzymatique ou non ? nous ne pouvons pas encore le préciser.

Toutefois, étant données, d'une part l'existence d'une décarboxylation spontanée de l'acide oxalacétique, d'autre part

la labilité plus grande de la liaison $C-SO_2H$ par rapport à celle de la liaison $C-CO_2H$, phénomène qui a été mis en évidence, au point de vue chimique, pour les acides aminés (aspartique et cystéine-sulfinique) et que l'on peut admettre également pour les acides cétoniques correspondants (oxalacétique et β -sulfinylpyruvique), l'hypothèse la plus probable et que nous envisageons, est celle d'une désulfination spontanée, non enzymatique, de l'acide β -sulfinylpyruvique, dans nos conditions d'expérience, ce qui n'exclut pas la possibilité d'existence d'une β -cétodésulfinicase pouvant accélérer la désulfination.

L'interférence du métabolisme de l'acide cystéine-sulfinique avec le métabolisme des autres acides aminés permet de concevoir que l'addition à un milieu biologique de substances telles que l'adénosine-tri-phosphate, le triphosphopyridine nucléotide et les ions manganèse, la thiamine et ses dérivés phosphorylés, puisse agir indirectement sur la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique. On sait, en effet, que le triphosphopyridine nucléotide et les ions manganèse jouent un rôle dans le passage de certains acides aminés aux acides cétoniques correspondants; on connaît d'autre part l'effet de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés sur le métabolisme des acides cétoniques : il a été établi récemment que la décarboxylation oxydative en α des acides cétoniques nécessite comme cofacteur un conjugué de diphosphate de thiamine et de l'amide de l'acide lipoïque (29).

Ces considérations permettent maintenant une interprétation possible de quelques faits observés au cours de cette étude et dont nous n'avons pas encore donné d'explications, à savoir :

1^o - L'inhibition pratiquement totale de la désulfination par les réactifs des groupements $-CHO-$ et $-CO-$ est due, pour une faible part, sans doute à l'action de ces substances sur le phosphate de pyridoxal qui joue peut-être un rôle de coenzyme dans la transamination, mais surtout au fait que les acides

cétoniques réagissent avec ces produits, et que le blocage des groupements cétoniques empêche la transamination de l'acide cystéine-sulfinique, donc, puisque cette transamination préalable est une étape indispensable, conduit à une suppression de la désulfination.

2° - Le rôle inhibiteur dans certaines conditions de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés peut s'expliquer par le fait que, en présence de ces groupements prosthétiques, les acides cétoniques qui existent dans le milieu subissent une décarboxylation oxydative en α et, par suite, les transaminations sont diminuées, ce qui limite l'importance de la désulfination. En ce qui concerne le rôle activateur, sur la désulfination de la thiamine et de ses dérivés phosphorylés, il se pourrait que ces substances exercent une influence sur le détachement du groupement $-SO_2$ de l'acide β -sulfinylpyruvique, bien que jusqu'ici leur action sur la décarboxylation en β des acides cétoniques n'ait jamais été établie.

3° - Le rôle activateur et inhibiteur de l'alanine et de l'acide aspartique selon la richesse du milieu réactionnel en acides cétoniques; dans le cas d'une préparation enzymatique possédant suffisamment d'acides cétoniques pour donner une réaction totale, l'addition d'alanine, produit final de la désulfination, ou d'acide aspartique, de structure analogue à celle de l'acide cystéine-sulfinique, bloque la désulfination, l'alanine en déplaçant l'équilibre dans le sens d'un retour à l'acide cystéine-sulfinique, et l'acide aspartique en étant lui-même transaminé concurremment à l'acide cystéine-sulfinique. Dans le cas d'une préparation enzymatique possédant peu d'acides cétoniques, l'alanine et l'acide aspartique peuvent, dans un milieu contenant les enzymes nécessaires, subir une désamination oxydative produisant les acides cétoniques servant à la désulfination.



II - ETUDE DE LA DECARBOXYLATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE L-CYSTEINE-SULFINIQUE IN VITRO.

Nous avons indiqué, au cours de l'étude de la désulfination, que la quantité d'acide cystéine-sulfinique qui disparaît, pendant l'incubation effectuée avec des préparations non dialysées ou réactivées par l'extrait de levure, est nettement plus grande que la quantité d'acide cystéine-sulfinique transformée en alanine et SO_2 . L'acide cystéine-sulfinique subit au moins une transformation autre que la désulfination. Nous entreprenons ici de déterminer le sort de cette fraction de substrat qui disparaît sans être désulfinée.

A - Techniques -

1 - Préparations enzymatiques :

Elles sont obtenues à partir de foie de lapin de la même manière que pour l'étude de la désulfination.

La préparation de l'extrait de levure a aussi déjà été décrite.

2 - Méthodes d'analyses et de dosages :

a) Chromatographie sur papier -

Le papier et les solvants employés sont identiques à ceux utilisés précédemment. La révélation est faite, pour tous les acides aminés, par la ninhydrine en solution à 0,2% dans le butanol; de plus, pour les acides aminés soufrés qui possèdent, liés au soufre, une fonction réductrice, nous nous sommes servis, comme agent révélateur du réactif à l'iodoplatinate (30) en solution dans l'acétone (31). Ce réactif est constitué par : 4 ml. d'acide chloroplatinique 0,002 M-; 0,25 ml. d'iodure de potassium 1 M-; 0,40 ml. d'acide chlorhydrique 2 N; 76 ml. d'acétone. Le chromatogramme, après évaporation du solvant de développement est baigné rapidement dans le réactif. Séché à

la température du laboratoire, il présente, sur fond rose, des taches blanches au niveau des acides aminés soufrés réducteurs.

b) Dosages de SO_2 , alanine, acide cystéine-sulfinique, azote aminé -

Nous nous sommes adressés aux mêmes techniques que celles utilisées pour l'étude de la désulfination.

c) Dosage de l'anhydride carbonique -

La méthode manométrique de Warburg a permis la mesure du dégagement d'anhydride carbonique à partir de nos préparations enzymatiques. Celles-ci devant fonctionner en tampon phosphate et la présence des phosphates entraînant le phénomène bien connu de rétention de CO_2 , il a été nécessaire de déterminer au préalable le coefficient de dégagement de CO_2 pour chaque mélange de tampon employé (à pH 4,5 : 87% - à pH 6,8 : 50% - à pH 8,3 : 0%).

3 - Composition des cellules -

Nous avons employé :

- d'une part les cellules déjà décrites, dans les conditions générales habituelles (volume, tampon, température, atmosphère, durée)
- d'autre part les cellules de l'appareil de Warburg, dans lesquelles on introduit :
 - 1,75 ml. de l'extrait aqueux dialysé.
 - 1,75 ml. de tampon phosphate pH 6,8 (5 ml. de phosphate monopotassique M/15 et 5 ml. de phosphate disodique M/15)
 - 0,50 ml. d'une solution de cystéine-sulfinat de sodium à 64 $\mu\text{mol/ml.}$ ou 0,50 ml. d'eau distillée.

Les expériences sont faites sous atmosphère d'azote à 35° et durent généralement 2 heures.

B - Résultats -

1 - Apparition d'un acide aminé nouveau au cours du métabolisme de l'acide cystéine-sulfinique.

L'analyse d'une solution dont on veut identifier les constituants appartenant à un même groupe (acides aminés, sucres, acides nucléiques) peut être réalisée d'une manière à la fois simple et précise à l'aide de la chromatographie sur papier. Aussi avons-nous appliqué cette technique à l'analyse de nos milieux réactionnels après incubation avec l'acide cystéine-sulfinique.

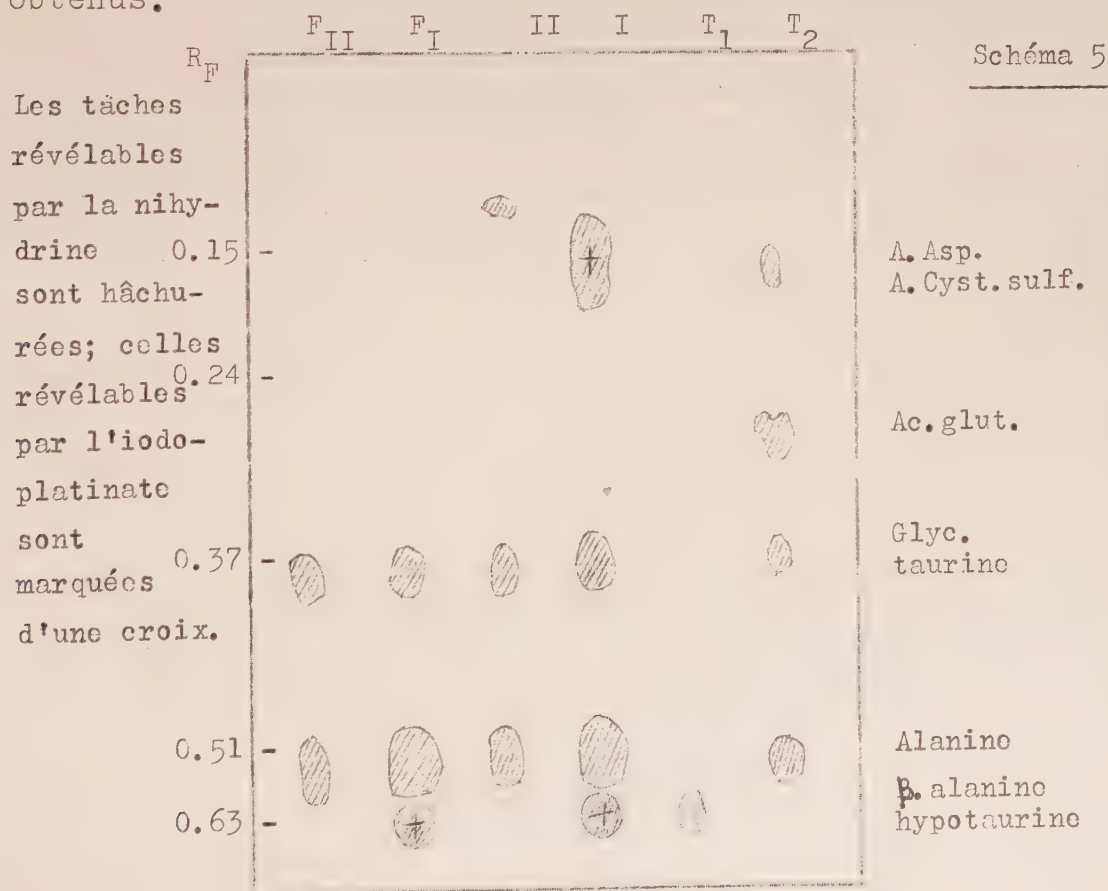
Ces milieux réactionnels sont préparés dans les conditions habituelles à partir d'extrait aqueux non dialysé et sans addition d'extrait de levure. Une cellule (I) contient de l'acide cystéine-sulfinique, une autre (II) est une cellule témoin. Après la réaction enzymatique on fait 2 chromatogrammes identiques à partir du liquide déprotéinisé de chaque cellule, en mettant parallèlement comme témoins, d'une part une solution aqueuse (10 ml.) contenant 20 mg. de chacun des acides aminés suivants : acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, alanine) d'autre part une solution aqueuse (10ml.) de 20 mg. de β -alanine. Les chromatogrammes développés dans le solvant phénol-1% de NH_3 sont révélés, l'un à la ninhydrine, l'autre à l'iodoplatinate. Ces chromatogrammes montrent, pour le liquide de la cellule qui contenait de l'acide cystéine-sulfinique :

- une tache importante, au niveau de l'acide aspartique, et correspondant à l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé, comme le révèle le réactif à l'iodoplatinate.
- une tache due à l'alanine et qui est plus importante que la tache correspondante du liquide de la cellule témoin.
- une tache, située au-dessous de l'alanine à un R_f voisin de 0,63, c'est-à-dire au niveau de la β -alanine. La substance responsable de cette tache est révélable à la ninhydrine et à l'iodoplatinate, et n'existe pas dans le liquide de la cellule témoin.

Les mêmes liquides déprotéinisés sont amenés à pH 5 et chromatographiés sur alumine acide; les filtrats (f_I et f_{II}) obtenus sont chromatographiés sur papier dans un solvant identique à celui précédemment utilisé; la tache de R_F voisin de 0,63 se retrouve sur ce chromatogramme. Ceci permet de conclure que la substance qui entraîne l'apparition de cette tache appartient au groupe des acides aminés neutres.

Enfin si l'on prépare des cellules identiques aux précédentes, mais dans lesquelles l'extrait enzymatique employé a été placé pendant 4 minutes au bain-marie bouillant avant introduction du cystéine-sulfinat, on ne voit sur les chromatogrammes du liquide réactionnel déprotéinisé de la cellule contenant de l'acide cystéine-sulfinique ni augmentation d'alanine par rapport à la cellule témoin, ni apparition de la tache R_F 0,63. Donc, on peut affirmer que c'est à une réaction enzymatique qu'est due la formation de la substance responsable de cette tache.

Le schéma 5 donne le type des principaux chromatogrammes obtenus.



Les résultats des chromatogrammes entraînent l'abandon d'une hypothèse, qui pouvait être faite, selon laquelle le sort le plus probable de la fraction d'acide cystéine-sulfinique disparue sans être désulfinée, aurait été une oxydation conduisant à la formation d'acide cystéine-sulfonique. On observe en effet, d'une part que l'acide cystéine-sulfonique n'apparaît en aucune façon sur les chromatogrammes, d'autre part que la substance inconnue se comporte comme un acide aminé neutre et réducteur. Cette substance, provenant de l'acide cystéine-sulfinique, contenant du soufre lié à une fonction réductrice, possédant un groupement aminé révélable à la ninhydrine et faisant partie du groupe des acides aminés neutres, semble se former par perte du groupement carboxylique de l'acide cystéine-sulfinique, selon l'équation :



Nous avons proposé d'appeler cette nouvelle substance : hypotaurine. Signalons ici qu'une nouvelle preuve de la structure de ce composé nous a été apportée par Awapara qui, poursuivant des expériences parallèles aux nôtres, avait observé aussi sur ses chromatogrammes, l'apparition d'une tache inconnue. Après avoir eu connaissance de nos résultats, il a oxydé par l'eau oxygénée, la substance éluée du papier et correspondant à la tache. Un nouveau chromatogramme fait après cette oxydation a révélé la présence de taurine. Ces résultats nous ont été aimablement communiqués par leur auteur avec autorisation d'en faire usage; ils ont été confirmés par des expériences analogues faites au laboratoire.

2 - Mise en évidence de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique aux manomètres de l'appareil de Warburg.

L'hypothèse de la décarboxylation en α de l'acide cystéine-sulfique conduisant à l'hypotaurine devait être vérifiée par

l'étude du dégagement de CO_2 à partir de préparations enzymatiques, et parallèlement par l'étude quantitative de la formation de cet acide aminé.

Les extraits aqueux utilisés ont été dialysés avant emploi, pendant 7 heures contre de l'eau distillée, de façon à éliminer toute activité de désulfination, le dégagement d'anhydride sulfureux dans les cellules des manomètres de l'appareil de Warburg pouvant interférer avec celui de l'anhydride carbonique. On opère en tampon phosphate, à pH 6,8 : des déterminations du dégagement d'anhydride carbonique en fonction du pH nous ayant amenés à considérer que le pH optimum de la décarboxylation, dans les conditions utilisées, était voisin de 6,8.

Après 2 heures de réaction, le contenu des cellules est transvasé quantitativement dans des tubes à centrifuger et déprotéinisé par la chaleur. Le liquide surnageant, amené à pH 5 est chromatographié sur alumine acide selon la technique habituelle. On effectue des dosages d'azote aminé sur l'éluat et le filtrat. L'éluat contient l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé, le filtrat contient l'hypotaurine formée. L'examen de la formule probable de l'hypotaurine montre qu'il s'agit d'un acide β -aminé. Pour appliquer la méthode de Van Slyke-Neill à cet acide aminé, il fallait auparavant vérifier que des acides β -aminés de structure analogue à celle de l'hypotaurine (β -alanine et taurine) étaient susceptibles d'être dosés par cette méthode. Des essais préliminaires ont établi que la teneur en β -alanine et en taurine d'une solution pouvait effectivement être ainsi déterminée de façon précise, ce qui permettait d'admettre que ce dosage était également valable pour l'hypotaurine.

Voici, à titre d'exemple, les résultats d'une expérience de décarboxylation.

TABEAU 26

Décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique

Cellules	μ mol. CO_2 dégagées	μ mol. acide aminé dans le filtrat	μ mol. acide aminé dans l'éluat
1: témoin	0	22,8	8,3
2: Ac. cyst. sulf.	15,0	37,1	30,6
2-1:	μ mol. CO_2 formées à partir de l'acide cystéine-sulfinique	μ mol. acide aminé neutre apparues dans le filtrat	μ mol. ac. cyst- sulfinique con- sommées
	15,0	14,3	14,9

Les chiffres du Tableau 26 indiquent :

- que la réaction conduisant à l'hypotaurine est bien une décarboxylation.
- que l'acide cystéine-sulfinique est décarboxylé en donnant de l'anhydride carbonique et de l'hypotaurine qu'on retrouve en quantités équimoléculaires dans le milieu réactionnel.

L'équation 2 proposée pour la seconde réaction enzymatique que subit l'acide cystéine-sulfinique est donc valable.

3 - Bilan de la désulfination enzymatique et de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique.

Ayant déterminé par les expériences précédentes l'existence d'un système enzymatique autre que celui responsable de la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique, il convenait de rechercher si l'ensemble des deux réactions de désulfination et de décarboxylation rendait compte de toute la quantité d'acide cystéine-sulfinique disparue au cours d'une incubation de ce substrat avec des préparations enzymatiques non dialysées.

La détermination de SO_2 et de l'alanine a permis de chiffrer l'importance des phénomènes de désulfination; quant à l'ampleur de la décarboxylation, le dosage de l'azote aminé provenant de l'hypotaurine en rend compte.

Dans un premier groupe de déterminations (tableau 27) l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé n'a pu être dosé à cause de la présence dans le milieu d'extrait de levure qui nuit considérablement à la précision du dosage de cet acide par la méthode de Schubert. Dans un second groupe de déterminations le dosage de l'acide cystéine-sulfinique a été fait, l'extrait de levure ayant été supprimé; ce qui entraîne, en contre partie, une diminution de l'intensité de la désulfination. (Tableau 28).

Les résultats des tableaux 27 et 28 montrent que les deux réactions de désulfination et de décarboxylation rendent compte de la totalité de l'acide cystéine-sulfinique disparu, dans les conditions où nous nous sommes placés.

TABLEAU 27

Bilan de SO_2 , alanine, acides aminés neutres totaux formés à partir de l'acide cystéine-sulfinique, en présence d'extrait de levure.

Cellule	$\mu\text{mol. SO}_2$	$\mu\text{mol. alanine}$	$\mu\text{mol. Ac. am. neutres}$	$\mu\text{mol. Ac. am. neutres-alanine}$
Exp. A				
1: témoin	3	70	317	247
2: Ac. cyst.	78	148	418	270
2-1	75	78	101	23
Exp. B				
1: témoin	1	69	486	417
2: Ac. cyst.	77	137	636	499
2-1	76	68	150	82

TABEAU 28

Bilan de SO_2 , alanine, acides aminés neutres totaux, formés, et de l'acide cystéine-sulfinique disparu, sans addition d'extrait de levure.

Cellules	μ mol. SO_2	μ mol. alanine	μ mol. Ac. am. neutres	μ mol. Ac. cyst. sulf.
1:témoin	4	23	86	65
2:Ac. cyst. sulf.	54	79	190	211
2-1	50	56	104	102

CONCLUSIONS

De l'examen des résultats précédents, il ressort que l'étude, en anaérobiose, de l'ensemble des dégradations subies par l'acide cystéine-sulfinique a conduit à des conclusions particulièrement intéressantes. En effet, elle a révélé l'existence d'un nouvel acide aminé soufré, l'hypotaurine, qui permet d'envisager un autre mode de passage de l'acide cystéine-sulfinique à la taurine, qui n'est plus une oxydation suivie d'une décarboxylation :

Acide cystéine-sulfinique $\xrightarrow{\text{oxydation}}$ Acide cystéine-sulfinique

$\xrightarrow{\text{décarboxylation}}$ Taurine

mais une décarboxylation suivie d'une oxydation :

Acide cystéine-sulfinique $\xrightarrow{\text{décarboxylation}}$ Hypotaurine

$\xrightarrow{\text{oxydation}}$ Taurine

La formation de taurine est un phénomène général chez les animaux supérieurs dont la bile renferme toujours de l'acide taurocholique. Or, si la décarboxylase de l'acide cystéine-sulfonique étudiée par Blaschko (6) rend compte, chez certaines espèces (porc, chien, rat, cobaye), de cette apparition de taurine donc d'acide taurocholique, cet enzyme fait défaut dans le foie d'animaux tels que le chat, le lapin, la morue. La mise en évidence d'un autre système enzymatique conduisant à la formation de taurine comble ainsi une grave lacune, et met en relief l'importance du nouvel intermédiaire qu'est l'hypotaurine dans le métabolisme général. Des travaux sont en cours au laboratoire pour isoler cette substance qui peut être le point de départ de nouvelles études portant entre autres sur :

- l'oxydation de ce corps en taurine dans les organes d'animaux pourvus ou dépourvus de décarboxylase d'acide cystéine-sulfonique.
- la réduction de cette hypotaurine en cystamine ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CH}_2.\text{SH}$) qui permettrait d'expliquer la formation de la partie soufrée de la molécule de coenzyme A, formation qui jusqu'ici ne peut être justifiée par les systèmes enzymatiques connus agissant sur les molécules soufrées, en effet l'hypothèse la plus immédiate pour rendre compte de la formation de cystamine serait une décarboxylation de la cystéine, mais l'existence de ce système enzymatique n'a jamais encore été établie.

La formation d'hypotaurine résulte, comme nous l'avons vu, d'une décarboxylation enzymatique de l'acide cystéine-sulfonique. Cet acide peut donc subir une décarboxylation en α comme un certain nombre d'acides aminés connus tels que : arginine, histidine, lysine, tyrosine, ornithine, acide glutamique, acide aspartique, dihydroxyphénylalanine, tryptophane, hydroxyphénylsérine, phénylalanine, acide cystéine-sulfonique (32). Des observations de Gale (33) ont montré que les aminoacides décarboxylés par les bactéries possèdent tous, en plus du groupement carboxylique en α par rapport au groupement aminé, un

troisième groupement polaire situé à l'extrémité opposée de la molécule, et que l'intégrité de ce troisième groupement polaire est indispensable pour que la décarboxylation ait lieu. Ces observations sont également valables pour l'acide cystéine-sulfinique qui possède en effet ce troisième groupement polaire : SO_2H à l'extrémité de la molécule.

D'autre part, la majeure partie des α -décarboxylases d'acides aminés connues jusqu'ici a comme groupement prosthétique le phosphate de pyridoxal. Il est permis d'envisager que la décarboxylase de l'acide cystéine-sulfinique requiert ce même groupement prosthétique pour son fonctionnement. Les méthodes employées jusqu'à maintenant pour la préparation des extraits enzymatiques utilisés dans ces recherches n'entraînent pas la dissociation du système décarboxylant, mais cela n'exclut pas l'existence possible d'un groupement prosthétique; en particulier, il est nettement établi, à la suite de nombreuses observations dont celles de Kuhn, que le phosphate de pyridoxal est fortement lié aux protéines. Des études sur la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique seront poursuivies.

Si l'on considère maintenant les derniers résultats obtenus, et qui concernent le bilan de la désulfination et de la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique, on constate que, en anaérobiose, la dégradation de l'acide cystéine-sulfinique est effectuée essentiellement par l'intermédiaire de ces deux réactions.

III - SORT DE L'ACIDE CYSTEINE-SULFINIQUE IN VIVO

Dans les deux premiers chapitres de ce travail nous avons montré qu'il existe, dans le foie des animaux supérieurs, deux systèmes enzymatiques agissant, in vitro et en anaérobiose, sur l'acide cystéine-sulfinique; il nous a paru utile de rechercher si, chez l'animal vivant, l'acide cystéine-sulfinique est dégradé de façon importante par ces deux systèmes enzymatiques ou s'il subit d'autres réactions d'une ampleur plus ou moins grande par rapport à la désulfination et à la décarboxylation. Pour cela nous avons injecté de l'acide cystéine-sulfinique à des rats et recherché les produits formés dans le foie des animaux sacrifiés après un temps convenable.

A - Techniques -

Les rats pèsent entre 135 et 185 g., et leur foie entre 5,0 et 7,0 g. On choisit les animaux témoins de poids aussi proche que possible de celui des animaux recevant l'acide cystéine-sulfinique. Les animaux sont préalablement soumis à un jeûne de 18 à 24 heures; ils sont ensuite anesthésiés à l'éther puis les rats témoins reçoivent par injection intraveineuse (patte ou verge) chacun 3 ml. d'une solution de NaCl à 0,9%, alors que les rats traités reçoivent de la même façon chacun 3 ml. d'une solution de NaCl à 0,9% contenant en outre 3 millimolécules de L-cystéine-sulfinat de sodium. Cette quantité d'acide cystéine-sulfinique correspond à la dose optima d'azote aminé que l'on peut injecter à ces animaux (34). Après 30 minutes, on sacrifie les animaux par section de la carotide; on prélève le foie que, après pesée, on plonge dans 5 fois son volume d'eau bouillante; on l'y maintient 10 minutes, puis, dans cette eau, on le broie au Turmix; on ajoute ensuite de l'eau bouillante de telle sorte que le volume total de l'eau soit 10 fois le volume initial du foie. La suspension ainsi obtenue est maintenue encore pendant 10 minutes au bain-marie bouillant, puis

est centrifugée. Selon la technique d'Awapara (35), le liquide est additionné de 5 fois son volume d'alcool absolu, et laissé 12 heures à la glacière. Après une nouvelle centrifugation, le liquide est additionné de 3 fois son volume de chloroforme et agité; après décantation, on obtient 2 couches. La couche aqueuse, jaune, est concentrée sous pression réduite pour éliminer l'alcool et le chloroforme, puis elle est amenée à 5 ml.

De cette solution, on prélève une première fraction de 2,5 ml. que l'on chromatographie sur une colonne de 5 g. d'alumine acide. Le filtrat est recueilli et concentré à 2 ml. Sur ce filtrat, on dose l'azote aminé neutre total et l'alanine. Sur la deuxième fraction, constituée par les 2,5 ml. restants, on dose l'azote aminé total. En outre, on prélève des échantillons de chacune de ces fractions que l'on chromatographie sur papier (Whatman n° 1, phénol à 1% NH_3). La révélation est faite par la ninhydrine.

B - Résultats -

Dans le tableau 29, nous donnons, à titre d'exemple, les résultats d'une expérience portant sur 5 rats, provenant d'une même portée et toujours maintenus dans la même cage. (2 rats témoins et 3 rats recevant de l'acide cystéine-sulfinique).

Dans le tableau 30, nous indiquons les moyennes des chiffres se rapportant à 20 animaux utilisés (10 témoins et 10 recevant de l'acide cystéine-sulfinique).

Voir tableaux 29 et 30 ci-après.

TABLEAU 29

Teneur en alanine, azote aminé total et azote aminé neutre,

par gramme de foie frais

Poids du foie (g.)	Ac. cyst. sulfi.	N aminé total (μ mol.)	N aminé neu- tre total (μ mol.)	Alanine (μ mol.)	N aminé neutre autre que l'ala- nine. (μ mol.)
7,0	0	12,6	6,90	1,44	5,46
6,3	0	20,8	9,15	1,99	7,16
6,9	+	36,7	22,90	3,42	19,5
7,9	+	33,4	19,40	3,53	15,9
6,0	+	47,2	22,5	2,15	20,4

TABLEAU 30

Moyennes des teneurs en alanine, azote aminé total, azote aminé

neutre par gramme de foie frais

Nbre d'ani- maux traités	Ac. cyst. sulfi.	N aminé total (μ mol.)	N aminé neu- tre total (μ mol.)	Alanine (μ mol.)	N animé neutre autre que l'ala- nine (μ mol.)
10	0	27,5	17,8	3,3	14,5
10	+	38,3	26,6	4,5	22,1

Le schéma 6 représente un chromatogramme préparé à partir des solutions aqueuses initiales et des filtrats obtenus par chromatographie de ces liquides sur alumine acide.

Schéma 6

F _T	F _A	S _T	S _A	
		o	o	Ac.Asp.
				A.Cyst-sulf.
		o	o	Ac.Glut.
o	o	o	o	Ser.
o	o	o	o	Glyc.
				taurine
o	o	o	o	Alanine
	o		o	hypotaurine

Il apparaît ainsi que les quantités d'azote aminé non protéique non neutre, d'azote aminé non protéique neutre autre que l'alanine, et d'alanine, sont nettement plus grandes dans le foie des animaux ayant reçu de l'acide cystéine-sulfinique (SA et FA), que dans celui des animaux témoins. (S_T et F_T) Les chromatogrammes montrent que les accroissements observés sont dus essentiellement, pour l'azote aminé non neutre à l'acide cystéine-sulfinique non métabolisé et pour une faible partie à l'acide glutamique. Pour l'azote aminé neutre les accroissements sont dus à l'alanine et à l'hypotaurine. Mais les quantités d'acide cystéine-sulfinique, d'acide glutamique, d'hypotaurine et d'alanine, retrouvées comme correspondant soit à l'acide cystéine-sulfinique non encore transformé, soit à ses produits de transformation, ne représentant qu'une faible fraction, de l'ordre de 5%, de l'acide cystéine-sulfinique introduit. Sans qu'il soit possible de faire de calcul précis, on peut en effet évaluer cependant pour un animal moyen dont le foie pèserait 6 à 7 g., la quantité d'acide cystéine-sulfinique retrouvé dans cet organe, à 60 μ mol., et celles de l'hypotaurine et de l'alanine à 80 et à 11 μ mol. respectivement, soit 150 mol. sur les 3.000 introduites. La quantité d'hypotaurine

est très supérieure à celle de l'alanine, soit que la décarboxylation soit plus intense que la désulfination, soit que l'alanine formée disparaisse plus vite que l'hypotaurine, entraînée dans l'ensemble du métabolisme.

Les chromatogrammes ne permettent de déceler la présence ni de taurine dont la tache se confondrait ici avec celle du glycocolle, ni d'acide cystéine-sulfonique.

CONCLUSIONS

Ces résultats montrent que les deux systèmes enzymatiques étudiés in vitro fonctionnent de façon importante chez l'animal vivant; des expériences actuellement en cours au laboratoire ont pour but d'étudier le sort de l'acide cystéine-sulfinique en fonction du temps qui s'écoule entre l'injection et le sacrifice de l'animal, et aussi de déterminer le catabolisme de cet acide dans d'autres organes, en particulier dans le rein.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Si l'on essaie maintenant de dégager, des résultats essentiels de ce travail, quelques conclusions générales, il apparaît que l'acide cystéine-sulfinique est susceptible de subir, in vivo comme in vitro, au moins deux types de dégradations enzymatiques : une décarboxylation et une autre transformation dont le premier stade est une transamination. Ces phénomènes de décarboxylation et de transamination se retrouvent fréquemment dans la dégradation des acides aminés, et il nous semble utile d'établir ici un parallèle entre les réactions qui portent sur trois acides aminés de formule analogue : l'acide cystéine-sulfinique, son homologue à un degré d'oxydation supérieur ; l'acide cystéine-sulfonique et son homologue carboné : l'acide aspartique, ainsi que de faire une comparaison entre les différents systèmes enzymatiques qui, chez les animaux supérieurs sont responsables de ces transformations.

D'après ce que l'on connaît des dégradations des acides aminés diacides, il est possible de mettre en évidence l'existence de trois groupes principaux de réactions portant :

- les unes sur le groupement carboxylique en α
- les autres sur le groupement acide en β
- enfin les dernières sur le groupement aminé.

a - Réactions portant sur le groupement carboxylique en α

Chez les trois acides étudiés ici, la décarboxylation en α peut avoir lieu, et ceci indépendamment de toute autre dégradation, mais cependant il faut remarquer que si cette réaction a été, pour l'acide cystéine-sulfonique (6) et pour l'acide cystéine-sulfinique mise en évidence dans les tissus animaux la décarboxylation en α de l'acide aspartique n'a été trouvée que chez les microorganismes. Chez ces derniers, la réaction

de décarboxylation nécessite la présence de phosphate de pyridoxal qui agit comme groupement prosthétique de la décarboxylase.

b - Réactions portant sur le groupement acide en β

Meister et col. (36) ont établi récemment que *Clostridium Welchii* était capable de décarboxyler quantitativement l'acide aspartique en α -alanine. Ceci représente un type unique de décarboxylation en β . Les mêmes auteurs ont montré que la présence d'acides α -cétoniques et de phosphate de pyridoxal dans le milieu réactionnel stimule cette décarboxylation et ils ont envisagé l'existence d'une relation entre la transamination et ce type de décarboxylation. D'autre part, Nakada et Weinhouse (37), étudiant l'oxydation de l'acide aspartique marqué sur le carbone β dans le foie du rat, ont trouvé que cet organe pouvait détacher le groupement carboxylique en β et proposé d'interpréter ce fait comme le résultat d'une transamination préalable formant de l'acide oxalacétique, lequel est ensuite décarboxylé en β pour donner de l'acide pyruvique.

Quant à l'acide cystéine-sulfonique, on ne connaît aucun système enzymatique capable de provoquer le détachement du groupement $-SO_3H$ de cette molécule.

Enfin, pour l'acide cystéine-sulfinique, nous avons établi que la désulfination ne peut se produire que lorsque le groupement aminé de la molécule a été supprimé par transamination.

c - Réactions portant sur le groupement aminé.

Celles-ci peuvent être de deux types, soit désamination oxydative directe par les deshydrogénases, soit transamination, c'est-à-dire remplacement du groupement aminé de la molécule par une fonction cétone. Nous étudierons rapidement ces deux modes de transformations.

- 1 - Désamination oxydative.

On ne connaît pas de L-aspartique oxydase dans les tissus animaux, c'est-à-dire qu'il n'existe pas dans ces tissus de système enzymatique permettant le passage direct de l'acide L-aspartique à l'acide oxalacétique.

De même, l'existence d'une deshydrogénase spécifique de l'acide L-cystéine-sulfonique n'a jamais été mise en évidence. Par contre, des travaux tout récents (38) indiquent la présence dans le coeur de certains animaux, d'une deshydrogénase de l'acide cystéine-sulfinique qui nécessite le coenzyme 3 pour son fonctionnement (39).

- 2 - Transaminations.

Il a été établi que les trois acides aminés étudiés ici peuvent participer aux réactions de transaminations. Une revue récente (40) a souligné l'importance de ces phénomènes de transaminations dans les dégradations qui se produisent dans les tissus animaux. On admet généralement que ces transaminases ont comme groupement prosthétique le phosphate de pyridoxal.

Désamination oxydative et transamination entraînent la formation, par détachement du groupement aminé de la molécule, des acides cétoniques correspondants aux acides aminés initiaux. Or cette désamination semble jouer un rôle particulièrement important puisqu'elle paraît être le stade préliminaire à certaines dégradations ultérieures de la molécule. En ce qui concerne les trois acides aminés qui nous intéressent, cette désamination de la molécule se fait presque exclusivement par transamination.

Ouvrons ici une parenthèse pour signaler, à propos de la désulfuration de la cystéine, l'influence accélératrice des acides cétoniques et ^{du} phosphate de pyridoxal sur cette réaction. Des travaux récents (41) tendent à prouver que cette désulfuration est obligatoirement précédée du détachement du groupement

NH₂ de la molécule. Ces résultats amènent à penser qu'il existe une certaine analogie entre le comportement de la cystéine et celui de l'acide cystéine-sulfinique vis-à-vis de différents systèmes enzymatiques.

Une étude comparative entre l'acide oxalacétique et l'acide β -sulfinylpyruvique, a déjà été amorcée dans nos conclusions sur la désulfination de l'acide cystéine-sulfinique. On peut y ajouter quelques remarques : ces deux acides cétoniques conduisent l'un et l'autre, après détachement de leurs groupements acides en β , à la formation d'acide pyruvique. Existe-t-il pour l'acide β -sulfinylpyruvique une décarboxylation en α entraînant la formation d'acétaldéhyde et une décarboxylation oxydative créant l'analogue soufré de l'acide malonique ? Ces questions n'ont pas encore été étudiées.

Quant à l'acide β -sulfoxyruvique, il n'est probablement pas métabolisé mais excrété sous cette forme, c'est ce que l'on peut admettre d'après les résultats de Schmidt et Clark (9) et ceux de Kearney et Singer. (42)

Nous pouvons conclure maintenant en soulignant les dégradations particulièrement nombreuses que peut subir l'acide cystéine-sulfinique qui prend part, dans les tissus animaux, à au moins 5 sortes de réactions :

- oxydation du groupement SO₂H.
- Décarboxylation en α .
- Désamination oxydative.
- Transamination puis
- Désulfination en β .

alors que ses homologues carboné ou soufré mais à un degré d'oxydation supérieur ne subissent, chez les animaux, qu'un nombre de réactions enzymatiques plus limité : à savoir, pour l'acide aspartique, essentiellement la transamination, et pour l'acide cystéine-sulfonique la transamination et la décarboxy-

lation en α .

Ces nombreuses réactions auxquelles prend part l'acide cystéine-sulfinique semblent être sous la dépendance d'au moins trois coenzymes ou groupements prosthétiques; pour l'oxydation et la désamination oxydative, le coenzyme 3; pour la décarboxylation en α et la transamination, le phosphate de pyridoxal; pour la désulfination peut-être, les dérivés thiaminiques. Etant donné que les deux derniers types de dégradation : décarboxylation en α et transamination désulfinante nous ont paru être les phénomènes essentiels, nous avons entrepris de déterminer, chez le rat, le retentissement d'un régime carencé en vitamine B₆ sur le sort de l'acide cystéine-sulfinique.

L'acide cystéine-sulfinique, que l'on considérait déjà comme un intermédiaire important dans le passage du soufre de la forme organique à la forme minérale, apparait maintenant, grâce à ses nombreuses possibilités de dégradation, comme une plaque tournante d'où le soufre peut, par deux voies différentes, être transformé en sulfate inorganique, et par deux autres voies donner de la taurine.

RESUME

Le présent travail traite des dégradations enzymatiques subies par l'acide L-cystéine-sulfinique : $\text{COOH-CH}(\text{NH}_2)\text{-CH}_2\text{-SOOH}$ et comporte trois parties.

Un premier chapitre est consacré à l'étude du mécanisme de la désulfination de cet acide, c'est-à-dire du passage du soufre de la forme organique à la forme minérale, et montre que le détachement du soufre ne se produit qu'après transamination préalable de la molécule d'acide cystéine-sulfinique avec un acide cétonique (α -cétoglutarique ou pyruvique) dont la pré-

sence est indispensable dans le milieu de réaction; les conditions optima de fonctionnement de cet ensemble de systèmes enzymatiques ont été déterminées; l'étude des phénomènes d'inhibition de cette désulfination confirme bien la nécessité de la transamination préalable puisque les inhibiteurs les plus efficaces sont les réactifs des groupements cétoniques.

L'étude quantitative de la désulfination, rendue possible grâce à une série de techniques que nous avons mises au point et qui permettent la séparation des différents produits formés au cours de cette réaction, a conduit à mettre en évidence l'importance de la désamination de la molécule, réalisée par transamination et qui est le stade préliminaire au détachement du groupement soufré, c'est-à-dire à la réaction portant sur le groupement acide en β .

Une seconde partie établit l'existence d'une autre réaction enzymatique : décarboxylation en α de la molécule d'acide cystéine-sulfinique, décarboxylation donnant naissance à une nouvelle substance, l'hypotaurine, qui intervient dans la genèse de la taurine; quelques propriétés de ce nouvel acide aminé, à savoir son comportement au cours de la chromatographie sur papier dans différents solvants et au cours de chromatographies sur colonnes d'alumine acide et de permutite 50 ont été précisées.

Enfin, et c'est l'objet du dernier chapitre, il a été prouvé que ces deux systèmes enzymatiques fonctionnent également chez l'animal vivant, ceci au moyen d'injections intraveineuses d'acide cystéine-sulfinique neutralisé à des rats, dont nous analysons ensuite la teneur du foie en hypotaurine, alanine et acides dicarboxyliques.

En conclusions, les résultats essentiels de ces recherches ont montré que les principales voies de dégradations de l'acide cystéine-sulfinique sont une transamination désulfinante et une décarboxylation en α , c'est-à-dire que l'acide cys-

téine-sulfinique est un pivot à partir duquel le soufre de la cystéine conduit à la formation soit de taurine par l'intermédiaire de la décarboxylation en α soit de sulfate grâce à la transamination désulfinante.

Il a paru utile de souligner la possibilité de l'influence du phosphate de pyridoxal sur ces deux réactions enzymatiques. De plus, nous avons établi un parallèle entre le métabolisme de trois acides aminés de structure analogue : l'acide aspartique, l'acide cystéine-sulfonique et l'acide cystéine-sulfinique dans les tissus animaux.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1 - C.Fromageot, dans J.B.Sumner et K.Myrbäck : The Enzymes, édité par Academic Press Inc. New-York 1950. Vol.II, première partie, p.609.
- 2 - C.Fromageot, E. Wookey, P.Chaix. Enzymologia 9 (1940) 198.
- 3 - D.D. Dziewiatkowski. J.Biol. Chem. 161 (1945) 723
- 4 - F. Bernheim, M.L.C.Bernheim. J.Biol.Chem. 127 (1939) 695
- 5 - G. Medes. Biochem.J. 33 (1939) 1559.
- 6 - H. Blaschko. Biochem.J. 36 (1942) 571 et H.Blaschko.Biochem. J. 39 (1945) 76.
- 7 - N.W.Pirie. Biochem.J. 28 (1934) 305.
- 8 - H. Blaschko. Advances in Enzymology 5 (1945) 67.
- 9 - C.L.A.Schmidt, G.W.Clark. J.Biol.Chem.53 (1922) 193.
- 10 -F.R. White, H.B.Lewis, J.White.J.Biol.Chem.117 (1937) 663.
- 11 - G. Medes, Biochem.J. 31 (1937) 1330.
- 12 - G. Medes, N.Floyd. Biochem.J. 36 (1942) 836.
- 13 - G. Medes, N.Floyd. Biochem.J. 36 (1942) 259.
- 14 - C.Fromageot, M.A.Royané. Helv.Chim.Acta 29 (1946) 1279.
- 15 - T.F.Lavine. J.Biol.Chem.113(1936) 580 et T.F.Lavine.J.Biol. Chem. 113 (1936) 583.
- 16 - M.P.Schubert. J.Am.Chem.Soc. 55 (1933) 3336.
- 17 - B.Alexander, G.Seligman. J.Biol.Chem. 159 (1945) 9.
- 18 - D.D.Van Slyke, J.Neill, J.Biol.Chem. 61-1924)523 et D.D.Van Slyke J.Biol.Chem. 83(1929)425.
- 19 - R.Consden, A.H.Gordon, A.J.P.Martin. Biochem.J.38(1944)224.
- 20 - R.Acher, M.Jutisz, C.Fromageot.Biochim.Biophys.Acta 5(1950) 493.
- 21 - C.Fromageot. P.Heitz. Microchim.Acta 3 (1938)52.

- 22 - R.J.D.Bolling, M.Webb. J.Biol.Chem.133(1940)XIV.
- 23 - T.Wieland.Z.Physiol.Chem.273(1942)24.
- 24 - M.Jutisz, E.Lederer. Médecine et Biologie 5 (1947) 229.
- 25 - D.D.Van Slyke, R.T.Dillon, D.A.Mc.Fayden, P.Hamilton.
J.Biol.Chem.141(1941)627.
- 26 - P.Cristol, C.Benezech, P.Cristol,J.Llory.Bull.Soc.Chim.Biol.
34(1952)123.
- 27 - P.Boulanger,G.Biserte.Bull.Soc.Chim.Biol.33(1951)1930.
- 28 - B.Vennesland, dans J.B.Sumner et K.Myrbäck : The Enzymes,
édité par Academic Press Inc. New-York 1950,Vol.II,
première partie p.182.
- 29 - L.J.Reed, B.G.Busk,J.Am.Chem.Soc.74 (1952)3457,3964,4727.
- 30 - H.M.Winegard, G.Toennies, R.J.Block. Science 108(1948)506.
- 31 - G.Toennies, J.J.Kolb, Anal.Chem.23(1951)823.
- 32 - O.Schales, dans J.B.Sumner et K.Myrbäck : The Enzymes,
édité par Academic Press Inc.New-York 1950.Vol.II,pre-
mière partie, p.216.
- 33 - E.F.Gale. Advances in Enzymology 6 (1946)1.
- 34 - F.Friedberg, D.M.Greenberg. J.Biol.Chem.168(1947)411.
- 35 - J.Awapara. Arch.Biochem.19 (1948)172.
- 36 - A.Meister, H.A.Sober, S.V.Tice, J.Biol.Chem.189(1951)577.
- 37 - H.I.Nakada, S.Weinhouse.J.Biol.Chem.187(1950)663.
- 38 - T.P.Singer, E.B.Kearney.Communication personnelle.
- 39 - T.P.Singer, E.B.Kearney.Biochim.Biophys.Acta(1952)700.
- 40 - P.P.Cohen, dans J.B.Sumner et K.Myrbäck : The Enzymes,édité
par Academic Press Inc.New-York 1950. Vol.I, première
partie, p.1040. seconde
- 41 - M.Suda, E.Kizu. The Journal of Biochemistry (Japon)39(1952)
28
- 42 - E.B.Kearney, T.P.Singer. Biochim.Biophys.Acta 8(1952) 698.

TABLE DES MATIERES

<u>Introduction</u> :	1
<u>Première Partie</u> : Synthèse de l'acide L-cystéine-sulfinique	4
<u>Deuxième Partie</u> : Métabolisme de l'acide L-cystéine sulfinique	8
I - Désulfination enzymatique in vitro	8
a) - techniques	8
- préparations enzymatiques	8
- composition des cellules	10
- méthodes de dosage	11
b) - mise au point de techniques	13
- séparation alanine et acide cystéine sulfinique	13
- action de la ninhydrine sur l'acide aspartique, l'acide cystéine sulfinique l'acide cystéine sulfonique et l'alanine	15
- séparation des dicarboxyliques et de l'acide cystéine sulfinique	19
c) - résultats	21
- nature enzymatique de la désulfination	21
- sort de la chaîne carbonée de la molécule	22
- détermination des conditions optima	25
- nécessité d'un cofacteur	27
- détermination de la concentration optima en acide cystéine-sulfinique et de la durée optima	34
- essai d'activation par des cofacteurs connus	36
- essai d'inhibition	40
- rôle des acides cétoniques	41
- détermination des produits formés au cours de la désulfination	42
- schéma général de la désulfination	45
- conclusions	47
II - Décarboxylation enzymatique in vitro	50
- techniques	50
- résultats	52
- apparition d'un acide aminé nouveau	52
- mise en évidence de la décarboxylation enzymatique	54
- bilan de la désulfination et de la décarboxylation	56
- conclusions	58
III - Sort de l'acide cystéine-sulfinique in vivo	61
- techniques	61
- résultats	62
- conclusions	65
Conclusions générales	66
Bibliographie	73

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

RÉPERCUSSION D'UNE CARENCE EN VITAMINE B₆ SUR LE MÉTABOLISME DES ACIDES AMINÉS CHEZ LES ANIMAUX SUPÉRIEURS

Vu et approuvé :

Paris, le 10 Juin 1953.

**Le Doyen de la Faculté des Sciences,
A. CHATELET.**

Vu et permis d'imprimer :

**Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean SARRAILH.**

